

**Chromatographie, Isolierung
und Strukturaufklärung
der Erdnuß- und Hefe-Sphingolipide**

Walter Zofcsik

1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555228_0014

Chromatographie, Isolierung und Strukturaufklärung der Erdnuß-
und Hefe-Sphingolipide

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Walter Zofcsik
aus
München

November 1965



Berichterstatter: Professor Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 12. 1965

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Zur Kenntnis der Sphingosine der Sphingolipide . . .	2
I. Bisherige Kenntnisse über die Chemie natürlich vorkommender Sphingosine	2
II. Die Analytik der Sphingosine	7
1. Die Hydrolyse der Sphingolipide und die Isolierung von Sphingosingewischen	7
2. Die Isolierung einzelner Sphingosine	8
3. Die papierchromatographische Trennung und Charakterisierung der Sphingosine	9
4. Die qualitative Analyse der Sphingosine mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	9
5. Die gaschromatographische Analyse der Sphingosinbasen	15
6. Die quantitative Bestimmung der Sphingosine .	19
7. a) Untersuchungen über die Sphingosine des Erdnußphytoglykolipids	25
b) Untersuchungen über die Sphingosine des Hefecerebrins	32
c) Untersuchungen über die Sphingosine der Mykoglykolipide aus Candida- und Saccharomyceshefen	37
d) Untersuchungen über die Sphingosine des Cerebrosids aus Candida utilis	40
B. Die Untersuchungen des Erdnußphytoglykolipidkomplexes	44
1. Bisherige Kenntnisse über ein Phytoglykolipid aus Erdnußsamen	44
2. Qualitativer Nachweis des Erdnußphytoglykolipids	44
3. Isolierung des Erdnußphytoglykolipidkomplexes	46
4. Strukturaufklärung des Erdnußphytoglykolipidkomplexes	48

C. Die Untersuchungen der Sphingolipide der Hefen <i>Candida utilis</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
1. Chromatographie der Sphingolipide	61
2. Isolierung der <i>Candida</i> - und <i>Saccharomyces</i> sphingolipide	65
3. Strukturaufklärung der Mykoglykolipide, Cerebrine und Cerebroside der Hefen	68
a) Die Mykoglykolipide von <i>Candida utilis</i> - und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Hefen	68
b) Die Cerebrine von <i>Candida utilis</i> -Hefe	75
c) Das Cerebrosid der <i>Candida utilis</i> -Hefe	80
EXPERIMENTELLER TEIL	85
A. Sphingosine	85
I. Allgemeine Methoden zur Isolierung, zum Nachweis, zur Strukturaufklärung und zur quantitativen Bestimmung der Sphingosine	85
1. Methoden zur Isolierung und Reindarstellung der Sphingosine	85
2. Methoden zum chromatographischen Nachweis, zur Strukturaufklärung und zur quantitativen Bestimmung einzelner Sphingosine	87
I. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Sphingosine und Phytosphingosine	87
II. Papierchromatographischer Nachweis der Sphingosine und Phytosphingosine	92
III. Gaschromatographie der aus den Sphingosinen und Phytosphingosinen durch Chromsäure- und Perjodsäureoxydation erhaltenen Aldehyde und Carbonsäure	93
IV. Hydrierung der Sphingosine im Mikromaßstab	96
V. Methoden zur quantitativen Bestimmung der Gesamtsphingosine	96
a) Die Bestimmung des Sphingosinstickstoffs	96
b) Die quantitative spektrophotometrische Bestimmung der Gesamtsphingosine	97

II. Die Untersuchung der Sphingosine der isolierten Sphingolipide	107
1. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine aus Rinderhirnsphingolipiden	107
2. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine aus Cerebrinen der <i>Candida utilis</i> -Hefe	109
3. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine der <i>Candida</i> - und <i>Saccharomyces</i> mykoglykolipide	112
4. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine des <i>Candida</i> cerebrosids	113
5. Isolierung und Identifizierung der Erdnußphyto- glykolipidsphingosine	115
B. Sphingolipide aus höheren Pflanzen und aus Mikroorganis- men	121
I. Qualitative Nachweismethoden für Sphingolipide	121
II. Isolierung und Reindarstellung von Erdnußphytoglyko- lipidkomplexen	123
III. Charakterisierung und Strukturaufklärung der Erdnuß- phytoglykolipidkomplexe	131
IV. Isolierung und Reindarstellung der Sphingolipide aus <i>Candida utilis</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	151
V. Strukturaufklärung der Mykoglykolipide von <i>Candida utilis</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	158
VI. Isolierung und Charakterisierung der Cerebrine der <i>Candida</i> hefe	164
VII. Nachweis und Isolierung eines Cerebrosids aus <i>Candi- da utilis</i>	169
VIII. Charakterisierung und Strukturaufklärung des <i>Candida</i> - cerebrosids	170

E I N L E I T U N G

Unter den Lipiden des menschlichen und tierischen Organismus gewinnen, wie auch aus der steigenden Zahl von Publikationen hervorgeht, die S p h i n g o l i p i d e immer größeres Interesse. Ihre Bedeutung für den tierischen Stoffwechsel ergibt sich aus der Tatsache, daß alle bekannten S p h i n - g o l i p i d e maßgeblich am Aufbau der Nervensubstanz und an der Bildung von Zellmembranen beteiligt sind.

Von den Esterphosphatiden unterscheiden sich die Sphingolipide in erster Linie dadurch, daß sie an Stelle von Glyzerin langkettige Aminobasen, die S p h i n g o s i n e enthalten. Diese stellen das charakteristische Strukturmerkmal der Sphingolipide dar.

Während die Sphingolipide lange Zeit als typische Lipid-Bestandteile höherer Tiere angesehen wurden, haben einige, in den letzten Jahren erschienenen Arbeiten Anhaltspunkte für die Existenz und weite Verbreitung der Sphingolipide auch im Pflanzenreich gebracht.

Da die Sphingolipide des Pflanzenreiches noch recht unvollkommen untersucht sind und noch ungeklärt ist, ob Sphingolipide von allen Organismenstufen des Pflanzenreiches gebildet werden, sind entsprechende systematische Untersuchungen an höheren und niederen Pflanzen erforderlich. Als Beitrag zu dieser Frage sollte im Vorliegenden die genaue chemische Zusammensetzung der Sphingolipide der E r d n u ß als eines Vertreters der höheren Pflanzen und die der H e f e n als Vertreter der niederen Pflanzen ermittelt werden.

Die vorliegende Arbeit bemüht sich außerdem um eine Verbesserung der Sphingolipid- und Sphingosin-Analytik, da das Studium der stoffwechselphysiologischen Eigenschaften der verschiedenen Sphingosine und ihr Nachweis in pflanzlichen Lipidextrakten nur mit exakteren Methoden sicher durchgeführt werden kann.

ALLGEMEINER TEIL

A. Zur Kenntnis der Sphingosine der Sphingolipide

I. Bisherige Kenntnisse über die Chemie natürlich vorkommender Sphingosine

Die 12 bis heute bekannten Sphingosine des Pflanzen- und Tierreiches stellen langkettige Aminobasen dar, die als Amino-diole und Amino-triole stets gebunden in den Sphingolipiden angetroffen werden. Folgende Sphingosinbasen konnten näher charakterisiert werden: C_{16} -, C_{17} -, C_{18} - und C_{20} -Sphingosine in Monoenform, 2 C_{18} -Sphingosine in Dienform, C_{18} - und C_{20} -Dihydrosphingosine, C_{18} -Dehydrosphingosin, C_{18} - und C_{20} -Phytosphingosine und C_{18} -Dehydrophytosphingosin. Über die Struktur der einzelnen Sphingosinbasen unterrichtet die Tabelle 1. C_{18} - und C_{20} -Sphingine, C_{18} - und C_{20} -Anhydrophytosphingosine und die 3-O-Methyläther der Sphingosine sind nicht genuinen Ursprungs, sondern stellen Artefakte der jeweiligen Sphingosine dar.

Das erste von THUDICHUM¹⁾ aus menschlichen Gehirnlipiden isolierte Sphingosin wurde von LEVENE²⁾ und LAPWORTH³⁾ als langkettiges Aminodiol mit einer Doppelbindung in 4,5-Stellung erkannt. Die dem Sphingosin ursprünglich zugewiesene Formel von $C_{17}H_{35}NO_2$ wurde von KLENK⁴⁾ in $C_{18}H_{37}NO_2$ abgeändert. KLENK schrieb dem Molekül die Struktur eines 1,2-Dihydroxy-3-amino-4-octadecens zu. Erst den Arbeiten von SEYDEL⁵⁾, CARTER⁶⁾⁷⁾ und KISS⁸⁾ ist die Klärung der eigentlichen Struktur dieses C_{18} -Sphingosins zu verdanken. Danach stellt das C_{18} -Sphingosin ein 1,3-Dihydroxy-2-amino-4-octadecen dar, dessen C-Atom 2 D(+)-Konfiguration⁹⁾¹⁰⁾ besitzt. Mit Untersuchungen der sterischen Konfiguration der Doppelbindung beschäftigten sich ONO¹¹⁾, MISLOW¹²⁾ und MARINETTI¹³⁾. Die Aminobase besitzt eine trans-olefinische Doppelbindung und zwei asymmetrische C-Atome, die zu einer erythro- und threo-Form der Base Anlaß geben. Die

erythro-Konfiguration der C-Atome 2 und 3 des genuinen Sphingosins konnte endgültig durch die Arbeiten von CARTER¹⁴⁾ und KISS¹⁰⁾ bewiesen werden.

Das C₁₈ - Dihydrosphingosin, das ebenfalls nativ vorkommt, wurde erstmals von LESUK und ANDERSON¹⁵⁾ aus den Larven von Taenia crassicolis isoliert und später von CARTER¹⁶⁾¹⁷⁾ aus der Cerebrosidfraction des Gehirn- und Nervengewebes gewonnen. Das Dihydrosphingosin ist ein

D(+)-erythro-1,3-Dihydroxy-2-amino-octadecan.

Das C₂₀ - Homologe des Sphingosins ist wie die C₁₆- und C₁₇-Sphingosine in der Monoenform und die C₁₈-Sphingosine in der Dienform¹⁸⁾ nur vereinzelt als Bestandteil von Sphingolipidmangetroffen worden. PROSTENIK¹⁹⁾ vermochte die C₂₀-Base aus Pferdegehirn zu isolieren. Er schrieb der C₂₀-Sphingosinbase die Struktur eines 1,3-Dihydroxy-2-amino-eicosens zu. Das C₂₀-Sphingosin besitzt ebenso wie sein C₁₈-Homologes eine D(+)- und erythro-Konfiguration²⁰⁾. Mit gewissen Einschränkungen kann der C₂₀-Base aus Pferdegehirn die Struktur eines

D(+)-erythro-1,3-Dihydroxy-2-amino-4-trans-eicosens zugeschrieben werden.

Über das natürliche Vorkommen des C₂₀ - Dihydro - sphingosins liegen nur vereinzelte Befunde vor^{21) 22)23)}.

Das Dehydrosphingosin, ein ungesättigtes Homologes des Dihydrosphingosins mit olefinischer Doppelbindung wurde von CARTER²⁴⁾ unter den Sphingosinen des Weizenmehlcerebrosids nachgewiesen. Seine endgültige Struktur ist noch nicht geklärt.

Im Gegensatz zu den Sphingosinen mit Aminodiolstruktur ist das Vorkommen der Aminotriole auf höhere Pflanzen und Mikroorganismen beschränkt. Ein Aminotriol stellt das Sphingosin aus den Cerebrinen der Hefen und den Schimmelpilzen dar, für das REINDEL²⁵⁾ die Struktur eines 4-Amino-1,3,5-trihydroxy-eicosans aufstellte. Dieses Sphingosin sollte in seiner Struktur mit der von BOHONOS und PETERSON²⁶⁾ aus dem Mycel von Asper-

gillus sydowi isolierten Base übereinstimmen. Außerdem wurde die nämliche oder eine ähnliche Base wiederholt auch aus anderen Drogenmaterialien isoliert²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾.

Für die von CARTER³¹⁾ aus Maisphosphatiden und von ODA³⁰⁾ aus einem Penicilliumstamm isolierte und als P h y t o s p h i n - g o s i n bezeichnete Base, die CARTER³¹⁾ fälschlicherweise mit dem Reindelschen Hefesphingosin für identisch hielt, wurde eine Summelformel von $C_{18}H_{39}NO_3$ ermittelt. Abweichend von den Angaben von REINDEL wird dem Phytosphingosin von CARTER die Struktur eines

2-Amino-1,3,4-trihydroxy-octadecans

zugeschrieben. Erst die neueren Untersuchungen von PROSTENIK und STANACEV³²⁾ haben ergeben, daß die Cerebrinbase aus Hefe die Struktur eines 2-Amino-1,3,4-trihydroxy-eicosans besitzt und sich somit von der Phytosphingosinbase CARTER's nur in der Kettenlänge unterscheidet. Bei einer weiteren Sphingosinbase, die durch längere Säurehydrolyse pflanzlicher Sphingolipide entsteht, handelt es sich um die A n h y d r o b a s e d e r P h y t o s p h i n g o s i n e . Sie wurde erstmals von REINDEL²⁵⁾ aufgefunden. CARTER³¹⁾ und O'CONNELL³³⁾ konnten beweisen, daß die Anhydrophytosphingosinbase der Maisphosphatide Tetrahydrofuranstruktur besitzt. Nach den Befunden CONNELL's stimmen die physikalischen Konstanten der isolierten C_{18} -Anhydrobase mit denen der Cerebrinanhydrobase überein. Die C_{20} -Phytosphingosinanhydrobase der Hefe besitzt ebenfalls Tetrahydrofuranstruktur³⁴⁾. Die freie Anhydrobase kommt in zwei Formen mit unterschiedlichem Schmelzpunkt vor³³⁾³⁴⁾. Die Hydroxyl- und Amidgruppe der Anhydrobase stehen zueinander in cis-Stellung³⁵⁾. Am C-Atom 3 konnte während der Bildung der Anhydrobase aus dem Phytosphingosin keine Epimerisierung beobachtet werden. PROSTENIK³⁴⁾ bezeichnet die Anhydrobase des Hefecerebrins als ein

3-Amino-2-n-hexadecyl-4--hydroxytetrahydrofuran.

Ein ungesättigtes Derivat des Phytosphingosins, das D e h y d r o p h y t o s p h i n g o s i n , fand erstmals MUELLER³⁶⁾ in Sojaphosphatiden. Nach PROSTENIK³⁷⁾ und CARTER²⁴⁾ handelt es sich bei der Dehydrophytosphingosinbase um folgende Ver-

bindung:

D(+)-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-8-trans-octadecen.

CARTER und HENDRICKSON³⁵⁾ konnten außerdem zeigen, daß sich die trans-Doppelbindung im Dehydrophytosphingosinmolekül in 8,9-Stellung befindet, Hydroxyl- und Amidgruppe zueinander in cis-Stellung stehen und dem Molekül auf Grund der Stellung seiner funktionellen Gruppen ribo-Konfiguration zukommt. So ergeben sich für die Phytosphingosine folgende Strukturen:

C₁₈-Phytosphingosin: D(+)-ribo-1,3,4-Trihydroxy-2-amino-octadecan

C₁₈-Dehydrophytosphingosin: D(+)-ribo-1,3,4-Trihydroxy-2-amino-8-trans-octadecen.

T a b e l l e 1

Die Struktur der Sphingosinbasen

Base	Struktur	Funktionelle Gruppen	
		-NH ₂	-OH
C ₁₈ (20)-Sphingosin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12(14)}-\text{CH}=\text{CH}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$ D(+)-erythro-1,3-Dihydroxy-2-amino-4-trans-octadecen(-eicosan)	1	2
C ₁₈ -Dihydrosphingosin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$ D(+)-erythro-1,3-Dihydroxy-2-amino-octadecan	1	2
C ₁₈ -Dehydrosphingosin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$ 1,3-Dihydroxy-2-amino-8-octadecen	1	2
C ₁₈ -Dehydrophyto-sphingosin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$ D(+)-ribo-1,3,4-Trihydroxy-2-amino-8-trans-octadecen	1	3
C ₁₈ (20)-Phyto-sphingosin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13(15)}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$ D(+)-ribo-1,3,4-Trihydroxy-2-amino-octadecan(-eicosan)	1	3
C ₂₀ -Anhydrophyto-sphingosin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\text{CH}}{\text{CH}}} \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$ 3-Amino-2-(n-hexadecyl)-4-hydroxytetrahydrofuran	1	1
C ₁₈ (20)-Sphingin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15(17)}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$ 1-Hydroxy-2-amino-octadecan(-eicosan)	1	1

II. Die Analytik der Sphingosine

Für die systematische Untersuchung der in den Sphingolipiden enthaltenen Sphingosine sind Standardmethoden erforderlich, die zum Nachweis und zur Isolierung der einzelnen Sphingosinkomponenten aller Sphingolipid-Typen geeignet sind. Wir versuchten deshalb universell anwendbare Isolierungsmethoden für Sphingosine auszuarbeiten und überprüften in diesem Zusammenhang bereits bekannte Methoden auf ihre Brauchbarkeit.

1. Die Hydrolyse der Sphingolipide und die Isolierung von Sphingosingemischen

Die relativ alkalistabilen Säureamidbindungen der Sphingolipide erfordern zu ihrer Spaltung in Gegensatz zu den alkalilabilen Esterphosphatiden andere Hydrolysenmethoden. Angewandt wurde die Hydrolyse mit 1-2n alkoholischer Säure oder eine verlängerte Hydrolyse mit gesättigter wässriger Bariumhydroxydlösung.

Zur Hydrolyse der Sphingolipide und zur Isolierung der Sphingosine und Phytosphingosine bedienten wir uns der Methoden von CARTER³¹⁾³⁸⁾, McKIBBIN³⁹⁾ und SWEeley⁴⁰⁾.

Die schonende alkalische Bariumhydroxydhydrolyse nach CARTER³⁸⁾ ist in der Mehrzahl der Fälle nicht anwendbar, da sie neben wenig Sphingosin oder Phytosphingosin eine beträchtliche Menge Ceramid ungespalten läßt. Eine gewisse Verbesserung des Verfahrens stellt die Kombination von Bariumhydroxyd- und Salzsäurehydrolyse dar³⁹⁾. Die sehr wirksame Methode der Schwefelsäurehydrolyse in Methanol³¹⁾ hat den Nachteil, daß sie vermehrt zur Bildung von O-Methyläthern der Sphingosine führt und die Entstehung der Anhydroform der Phytosphingosine begünstigt. Die Methode der Salzsäurehydrolyse⁴⁰⁾ erwies sich bei einer durchschnittlichen Dauer von 6 Stunden in allen Fällen am geeignetsten, da sie die Sphingosine und Phytosphingosine aus den meisten Sphingolipiden ohne größere

Veränderungen der Aminobasen quantitativ freisetzt. Anhydro-phytosphingosinbasen und O-Methyläther der Sphingosine entstehen hier in geringerem Umfang als bei der Schwefelsäurehydrolyse.

Als einziges wasserlösliches Sphingolipid erfordert das Gangliosid eine spezielle Hydrolysenmethode. Sie besteht nach KUHN⁴¹⁾ in der zweistufigen Hydrolyse mit 80%iger Ameisensäure und 0.2n Salzsäure. Die freigesetzten Aminobasen wurden aus der alkalisch gemachten und von der Hauptmenge an Alkohol befreiten Hydrolysenlösung mit Diäthyläther oder Chloroform extrahiert.

Das einfachste **R e i n i g u n g s v e r f a h r e n** für Sphingosingemische ist die wiederholte Umkristallisation der Basen aus Methanol und Äther. Die Methode von CARTER³¹⁾ erlaubt die Herstellung gut kristallisierender Sphingosinderivate wie der Sulfat- und Acetonderivate und der Rückgewinnung der Sphingosine aus diesen Verbindungen. Demgegenüber ist die Methode der säulenchromatographischen Reinigung der Sphingosine nach SWEELEY und MOSCATELLI⁴⁰⁾ nach unseren Erfahrungen das wirksamste und zeitsparendste Reinigungsverfahren für Sphingosine und Phytosphingosine.

2. Die Isolierung einzelner Sphingosine

Der Mangel an einfachen Methoden zur Isolierung einzelner Sphingosine aus einem unveränderten Sphingosinbasengemisch veranlaßte uns die quantitative Fraktionierung der Aminobasen an einer Kieselgelsäule zu versuchen. Die chromatographische Trennung der Sphingosine an einer **K i e s e l g e l s ä u l e** unter Verwendung von Chloroform-Methanolgemischen führte nur zu einem Teilerfolg. Mit Ausnahme der Trennung der Phytosphingosine (Phytosphingosin und Dehydrophytosphingosin) von ihren Anhydroformen und der Phytosphingosine von Dihydrosphingosinen konnten wir meist nur eine gewisse **Anreicherung** der einzelnen Sphingosinbasen erreichen. Diese Befunde stehen in Einklang mit ähnlichen Beobachtungen von CARTER³⁵⁾.

Auch durch Anwendung der **p r ä p a r a t i v e n D ü n n - s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i e** gelangen nur kleine

Verbesserungen.

Eine weitgehende, jedoch nicht vollständige säulenchromatographische Auftrennung der Sphingosine kann nach der Methode von WITTENBERG⁴²⁾ durch phasenvertauschte Verteilungschromatographie der N-Succinyl-derivate der Sphingosine erreicht werden.

Nach unseren Erfahrungen stellt augenblicklich die Gegenstromverteilung die Trennmethode der Wahl dar³⁵⁾⁴³⁾⁴⁴⁾.

3. Die papierchromatographische Trennung und Charakterisierung der Sphingosine

Die bekannten Verfahren zur papierchromatographischen Trennung und Charakterisierung der Sphingosinbasen erlaubten meist nur den Nachweis des Sphingosins⁴⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾ und des Dihydro-sphingosins⁴⁶⁾⁵⁰⁾. Am häufigsten kam für die Sphingosine das von PALAMETA und PROSTENIK⁵¹⁾ entwickelte Verfahren der Silica-gelchromatographie und für die Dinitrophenylderivate der Sphingosine die Umkehrphasenchromatographie nach KARLSSON⁴⁶⁾ zur Anwendung.

Die bisher bekannten Methoden versagten bei der Chromatographie komplexer Sphingosingemische und eigneten sich deshalb vielfach nur zum allgemeinen, nicht differenzierenden Nachweis der Sphingosine. Sie erfordern darüberhinaus einen verhältnismäßig großen Zeitaufwand, speziell präparierte Chromatogrammpapiere und zum Teil die Darstellung von Sphingosinderivaten. Ihre Trennleistungen befriedigen nicht.

4. Die qualitative Analyse der Sphingosine mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Eine schnelle und gute Trennung der Sphingosine und Phytosphingosine erzielten wir mit der von uns entwickelten Methode der ein- und zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie der Sphingosinbasen auf Kieselgel-G- oder Kieselgur-G-Schichten unter Ver-

wendung der Systeme $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ in unterschiedlicher Phasenzusammensetzung (siehe Tab. 2).

T a b e l l e 2

Eindimensionale Dünnschichtchromatographie der Sphingosine und Phytosphingosine auf aktivierten Kieselgel-G-Platten

R_F -Werte der Aminobasen

Aminobasen	Laufmittelsysteme			
	$\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O (65:25:4)}$	$\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O (65:30:5)}$	$\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O (70:22:3)}$	$\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_3 (4:1:0.1)$
Phytosphingosine, Dehydrophytosphingosine	0.27-0.29	0.385-0.394	0.341	0.157
Anhydrophytosphingosine	0.55-0.56	0.64 -0.65	0.66	0.59
Dihydrosphingosine	0.37-0.39	0.44 -0.45	0.45-0.46	0.26
C_{18} -Sphingin	0.38-0.39	0.47	0.47-0.48	
C_{20} -Sphingin	0.39-0.40	0.51	0.49-0.50	
threo- C_{18} -Sphingosin	0.41-0.42	0.53	0.52	
erythro- C_{18} -Sphingosin	0.44-0.45	0.54	0.54	0.34
O-Methyläther d.Sphingosine	0.52-0.53	0.61	0.61	0.42
1,3-Dihydroxy-2-amino-4-octadecin	0.54	0.70	0.68	

Das Verfahren erlaubt die Chromatographie der unveränderten, genuinen Sphingosine in Mikromengen. Der Zeitaufwand für die Durchführung der Chromatographie ist verglichen mit dem des papierchromatographischen Nachweises wesentlich geringer. Die gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens ermöglicht eine exakte

Bestimmung der R_f -Werte (Abweichung: ± 0.02 s. Tab.2, S.10). Durch die gewählten Anfärbeverfahren können sämtliche Sphingosine mit hinreichender Genauigkeit nachgewiesen werden. Durch differenzierende Anfärbung mit Cyclodextrinreagens oder mit Jod- bzw. Osmiumtetroxyddampf lassen sich die gesättigten und ungesättigten Sphingosinbasen eindeutig voneinander unterscheiden. Als besonders empfindlich erwies sich der Nachweis der Sphingosine mit dem Ninhydrinreagens. Hiermit können im Mittel 2-4 μg Sphingosine und Dihydrosphingosine oder 10-15 μg Phytosphingosine noch gut identifiziert werden. Die Empfindlichkeit des Nachweises ergibt sich aus folgenden Grenz- und Mittelwerten:

	Nachweisgrenze μg	Mittelwert μg
Dihydrosphingosine	1.0	1.5 - 4.0
Sphingosine	1.2	1.5 - 4.0
Phytosphingosine	3.0 - 5.0	10.0 -15.0
Anhydrophytosphingosine	3.0 - 5.0	10.0 -15.0
Rinderhirnsphingosine (Gemisch)	4.0 - 5.0	15.0
Erdnußsphingosine (Gemisch)	20.0 -25.0	35.0 -40.0

Anhand von Modellmischungen, die sich aus C_{20} -Phytosphingosin, Dehydrophytosphingosin, Anhydrophytosphingosin, C_{18} -Dihydrosphingosin, C_{18} - und C_{20} -Sphinginen, C_{18} -Sphingosin(erythro- und threo-Form) und dem 3-O-Methyläther des Sphingosins zusammensetzen, läßt sich die Trennleistung des neuen dünn-schicht-chromatographischen Verfahrens demonstrieren.

Wie das Chromatogrammschema (Abb.1, S.12) und ein Vergleich der in Tabelle 2, S.10, enthaltenen R_f -Werte zeigt, gestattet die dünn-schicht-chromatographische Methode die Trennung der Phytosphingosine und Dehydrophytosphingosine von den Dihydrosphingosinen, Sphinginen und den bei der sauren Hydrolyse als Artefakt auftretenden Anhydrophytosphingosinen. Das zweidimensionale Verfahren, das eine besonders gute Trennung der Phyto- und Dehydro-

phytosphingosine, Dihydrosphingosine und Anhydrophytosphingosine liefert (Chromatogrammschema Abb. 2, S.13) eignet sich vor allem zur präparativen Gewinnung der einzelnen Sphingosine.



Abb. 1

Dünnschichtchromatographische Trennung pflanzlicher und tierischer Sphingosine

Kieselgel-G; Fließmittel: CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4)

A = C_{20} -Phytosphingosin

B = C_{18} -Dihydrosphingosin

C = C_{18} -Sphingin

D = C_{20} -Sphingin

E = C_{18} -, C_{20} -Anhydrophyto-
sphingosine

F = C_{18} -Sphingosin

G = 3-O-Methyläther des C_{18} -
Sphingosins

H = Gemisch aus C und B

I = Gemisch aus A, C und E

K = Gemisch aus A, B, C und E

L = Gemisch aus B, C, D, F und G

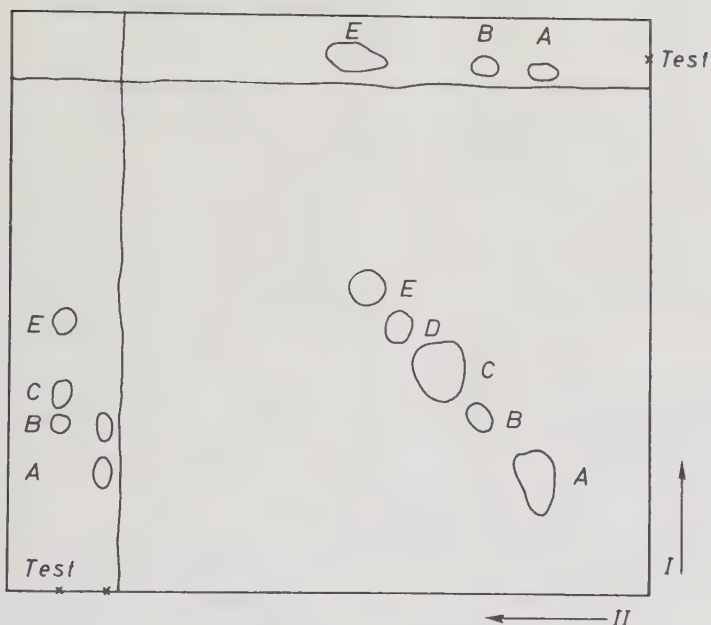


Abb. 2

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie pflanzlicher und tierischer Sphingosine

Kieselgel-G; Fließmittel in beiden Richtungen: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$
(65:25:4)

A = C_{20} -Phytosphingosin

B = C_{18} -Dihydrosphingosin

C = C_{18} -Sphingosin

D = 3-O-Methyläther des C_{18} -Sphingosins

E = C_{18} -, C_{20} -Anhydrophyto-sphingosine

Bei Untersuchung von Sphingosingemischen tierischer Herkunft lassen sich, wie aus Abb.1, S.12, und aus der Tabelle der R_f -Werte (Tab. 2, S.10) zu ersehen ist, die Sphingosine, Dihydrosphingosine, Sphingine und O-Methyläther der Sphingosine sowie

sterische Formen der Sphingosine(erythro- und threo-Sphingosine) mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen Methode gut voneinander trennen.

Besonders eindrucksvoll ergibt sich die Leistungsfähigkeit der verschiedenen dünn-schichtchromatographischen Methoden aus folgendem Versuch: Läßt man auf Hefecerebrine und ihre Sphingosine oder auf pflanzliche Sphingolipide z.B. das Erdnußphosphoglykolipid Säuren unterschiedlicher Konzentration verschieden lang einwirken, so findet man neben Cerebrinen und Phytosphingosinen die verschiedenen Anhydroformen dieser Verbindungen, die Anhydrocerebrine und Anhydrophytosphingosine. Auch diese lassen sich, was bisher nicht möglich war, dünn-schichtchromatographisch voneinander und von ihren Ausgangsprodukten trennen (Abb.3, Tab. 3).

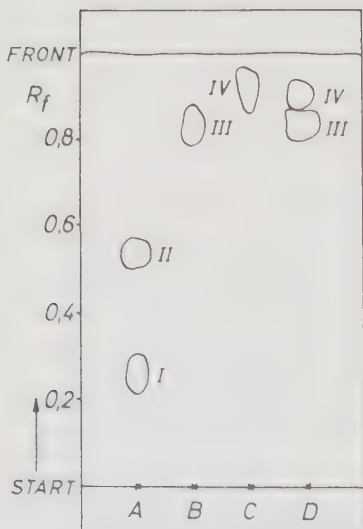


Abb. 3

Dünn-schichtchromatographische Trennung von C_{18} -, C_{20} -Phytosphingosinen (I), C_{18} -, C_{20} -Anhydrophytosphingosinen (II), Cerebrin aus *Candida utilis*-Hefe (III) und Anhydrocerebrin (IV)

Kieselgel-G

Fließmittel: $CHCl_3$ -MeOH- H_2O
(65:25:4)

T a b e l l e 3

R_f -Werte des Cerebrins und Phytosphingosins und ihrer Anhydroformen

Verbindungen	Fließmittel		
	CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4)	CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:30:5)	CHCl_3 + 10% MeOH
Cerebrin	0.83	0.91	0.45
Anhydrocerebrin	0.91	0.97	0.89
Phytosphingosin	0.27	0.39	0.04--
Anhydrophyto- sphingosin	0.54	0.64	-0.23

Obwohl die dünnschichtchromatographische Methode allein keine endgültige Aussage über die Struktur der Sphingosine und die genaue Zusammensetzung der Sphingosingemische erlaubt, da verschiedene Homologe, wie C_{18} - und C_{20} -Phytosphingosine, C_{18} - und C_{20} -Sphingosine und C_{18} - und C_{20} -Dihydrosphingosine nicht mit hinreichender Sicherheit getrennt werden können, lassen sich mit ihrer Hilfe tierische und pflanzliche Sphingosine leicht voneinander unterscheiden. Die Dünnschichtchromatographie der Aminobasen erleichtert die Überwachung der einzelnen Fraktionierungsschritte bei der quantitativen Auftrennung der Sphingosine und dient außerdem zur Reinheitsprüfung der Sphingosine.

Nach Abschluß unserer Untersuchungen erschienen Arbeiten von FUJINO.⁵²⁾ KOCHETKOV⁵³⁾ und SAMBASIVARAO.⁵⁴⁾, die sich mit Teilproblemen der dünnschichtchromatographischen Auftrennung tierischer Sphingosinbasen unter Verwendung andersartig zusammengesetzter Fließmittel beschäftigten. Die Verfahren weisen gegenüber den von uns entwickelten keine Vorteile auf.

5. Die gaschromatographische Analyse der Sphingosinbasen

Die Grundlage der gaschromatographischen Analyse der Sphingosine bildeten die bekannten Verfahren von MAJHOFFER-ORESCANIN und PROSTENIK⁵⁵⁾ und SWEeley und MOSCATELLI⁴⁰⁾. Nach diesen Verfahren werden die Aminobasen mit Perjodsäure bzw. Chrom-

säure oxydiert, die Spaltprodukte gaschromatographisch charakterisiert und den einzelnen Sphingosinen zugeordnet.

Die Identifizierung der bei der Oxydation der Sphingosinbasen aufgetretenen Aldehyde und Carbonsäuren nahmen wir mit Hilfe der im Versuchsteil beschriebenen polaren und unpolaren Säulenfüllungen vor. Zur Analyse der Aldehyde bewährte sich eine durch Imprägnieren von Chromosorb WS 0.2 - 0.3 mm oder Kieselgur für Gaschromatographie, Merck 0.2 - 0.3 mm mit 20% Reoplex 400, Merck bzw. LAC-1R-296-Polyester erhaltene Säulenfüllung, deren Restaktivitäten durch Behandeln mit 0.2% Natriumcapronat beseitigt wurden. Zur Analyse der Carbonsäuren bedienten wir uns vorwiegend einer unpolaren Säulenfüllung aus Apiezon L (20%) und Chromosorb WS 0.2 - 0.3 mm. Die Charakterisierung der Aldehyde und Carbonsäuren nahmen wir anhand von Vergleichssubstanzen vor. Zur vollständigen Erfassung der bei der Oxydation aufgetretenen Carbonsäuren hat sich eine Programmierung der Arbeitstemperatur (120 - 220°C) als zweckmäßig erwiesen.

Für die exakte Strukturanalyse schlagen wir eine Kombination der beiden Oxydationsverfahren vor.

Die P e r j o d s ä u r e o x y d a t i o n bewirkt eine Glykolspaltung der Sphingosine ohne deren Doppelbindung anzugreifen. Nach anschließender Hydrierung des ungesättigten Aldehyds kann aus dem gaschromatographischen Verhalten des hydrierten Aldehyds auf die Kettenlänge, Stellung und Anzahl der Hydroxylgruppen des Sphingosins geschlossen werden. Der C h r o m - s ä u r e a b b a u der ungesättigten Sphingosine führte neben einer Glykolspaltung zur oxydativen Spaltung der Doppelbindung der Aminobasen. Die dabei entstandenen Carbonsäuren geben Aufschluß über die Lage und die Anzahl der Doppelbindungen.

Am Beispiel der Sphingosine des Rinderhirncerebrosids sei das gaschromatographische Analysenverfahren erläutert.

Nach P e r j o d s ä u r e o x y d a t i o n der Cerebrosid-sphingosine lassen sich gaschromatographisch Tetradecanal (1), Hexadecanal (2), Hexadecenal (3) und Methylheptadecenal (4) (Abb. 4, S.17) identifizieren. Die Zuordnung ergibt C₁₆-Di-

hydrosphingosin, C₁₈-Dihydrosphingosin, C₁₈-Sphingosin und den O-Methyläther des C₁₈-Sphingosins. Hexadecenal ließ sich zu Hexadecanal hydrieren.

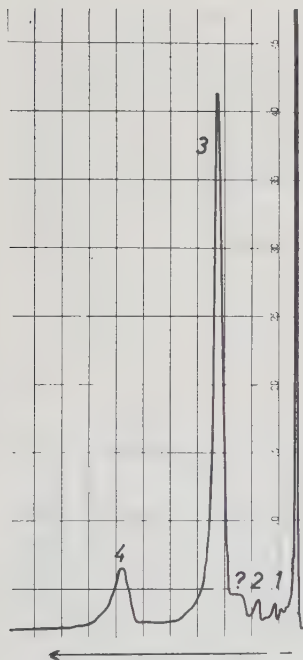


Abb. 4

Gaschromatographie der durch Perjodsäureoxydation aus den Sphingosinen der unveresterten Rinderhirncerebroside erhaltenen Aldehyde

Säulenfüllung: 20% Reoplex 400 Merck auf Chromosorb WS 0.2-0.3 mm

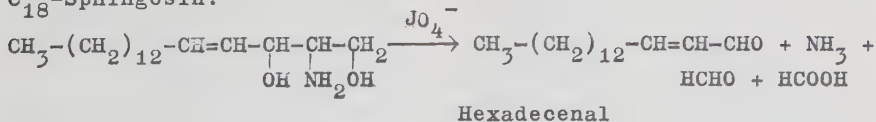
Säulendimensionen: 240 mm lang und 4 mm inn.Durchm.

Temperatur: 210°C

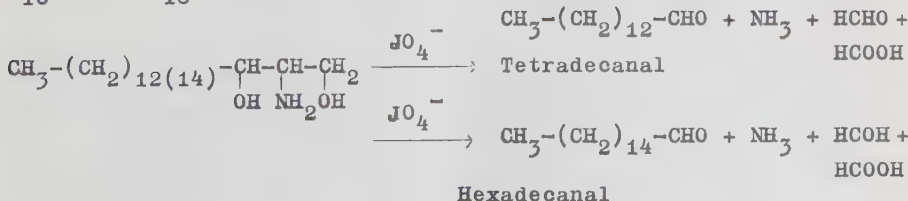
Gas: 1.05 kg/cm² = 160 ml H₂/Min.

Schema der Perjodsäureoxydation für:

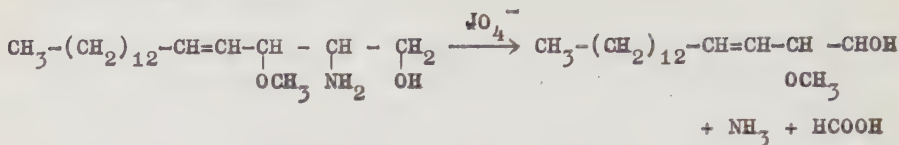
C₁₈-Sphingosin:



C₁₆- bzw. C₁₈-Dihydrosphingosin:



O-Methyl-C₁₈-Sphingosin:

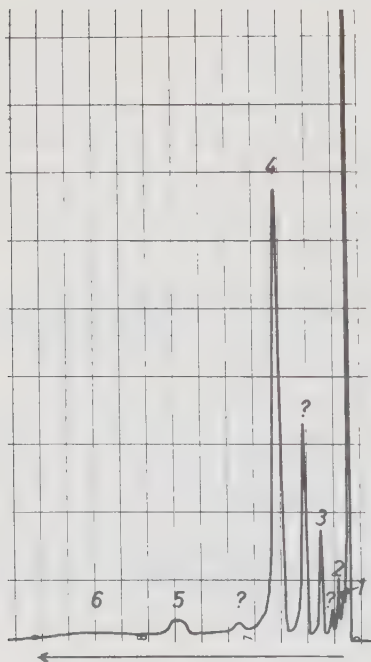


2-O-Methylheptadecenal

Aus dem Gaschromatogramm der erhaltenen Aldehyde kann außerdem die ungefähre quantitative Verteilung der Sphingosinbasen im Gemisch ermittelt werden.

Als Spaltprodukte der Chromsäureoxydation der Sphingosine identifiziert man unter anderem Myristinsäure, Palmitinsäure (Abb. 5) und Oxalsäure.

Abb. 5



Gaschromatographie der durch Chromsäureoxydation aus den Sphingosinen der unveresterten Rinderhirncerebroside erhaltenen Carbonsäuren

Säulenfüllung: 20% Apiezon L auf Chromosorb W 0.2-0.3 mm

Säulendimensionen: 120 mm lang u. 4 mm inn. Durchmesser

Temperatur: 200°C

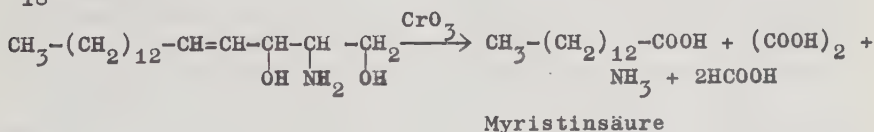
Gas: 0.5 kg/cm² = 140-150 ml H₂/Min.

- 1 = Glutarsäure
- 2 = Adipinsäure
- 3 = Laurinsäure
- 4 = Myristinsäure
- 5 = Palmitinsäure
- 6 = Heptadecansäure

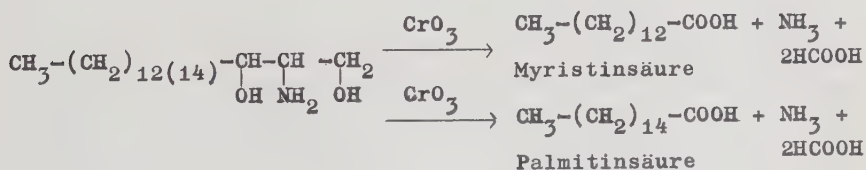
Diese können dem C₁₆-Dihydrosphingosin, dem C₁₈-Dihydrosphingosin und dem C₁₈-Sphingosin zugeordnet werden. Das Auftreten der Myristinsäure und der Oxalsäure weist auf die Lage der Doppelbindung in 4,5-Stellung im C₁₈-Sphingosin hin. Myristinsäure ist das Spaltprodukt des C₁₆-Dihydrosphingosins und Palmitinsäure das des C₁₈-Dihydrosphingosins.

Schema der Chromsäureoxydation:

C₁₈-Sphingosin:



C₁₆- bzw. C₁₈-Dihydrosphingosin:



6. Die quantitative Bestimmung der Sphingosine

Die bisher am meisten verwendete quantitative Bestimmungsmethode von McKIBBIN und TAYLOR³⁹⁾ basiert auf der Ermittlung des Sphingosinstickstoffs. Die von CARTER⁶⁾⁷⁾ und BRADY⁵⁶⁾ benutzte Methode bedient sich der Perjodsäureoxydation und misst die Menge an verbrauchtem Perjodat bzw. an gebildetem Formaldehyd. Nach SAKAGAMI⁵⁷⁾ können Sphingosine mit Schiff'schem Reagens bestimmt werden. Nach dem Verfahren von SAITO⁵⁸⁾ wird die Farbtiefe eines Sphingosin-Fluoreszeinkomplexes photodensitometrisch aus gemessen.

Die meisten der erwähnten Verfahren ermöglichen keine exakte Bestimmung der Sphingosine. Die teilweise komplizierte Handhabung der Bestimmungsmethoden schränkt ihre Anwendbarkeit erheblich ein.

Die Notwendigkeit, die quantitativen Sphingosinbestimmungsmethoden zu vereinfachen und ihre Genauigkeit zu erhöhen, wurde bereits von LAUTER⁵⁹⁾ erkannt. Das von ihm entwickelte spektrophotometrische Verfahren zur Bestimmung des Sphingosingehaltes (Methylorangemethode), das bisher ausschließlich zur Ermittlung des Sphingosingehaltes der tierischen Sphingolipide diente, wurde von uns so abgewandelt und verbessert, daß mit ihm nunmehr der Gehalt an tierischen wie pflanzlichen Sphingosinen gleich gut bestimmt werden kann.

Die erste Verbesserung besteht darin, daß wir alle Lipide, wie Fettsäuren, die mit dem Methylorangereagens reagieren und die Sphingosinwerte verfälschen können, vor der Bestimmung aus dem Hydrolysat entfernen. Cholin, Galaktosamin, Hexuronsäure und Sialinsäure, die vereinzelt bei der Hydrolyse der Sphingolipide entstehen, wirkten sich nach unseren Feststellungen nicht störend auf die Methode aus.

Für die Ermittlung des Sphingosingehaltes wurden neue Eichkurven aufgestellt. Da die Eichkurven des C_{18} -Dihydrosphingosins, des C_{18} -Sphingosins, des C_{18} -Sphingins, des C_{20} -Phytosphingosins und des Anhydrophytosphingosins voneinander abwichen, wurden die Sphingosinwerte auf Eichkurven bezogen, die jeweils der Hauptkomponente des zu bestimmenden Sphingosingemisches entsprachen. Den Eichkurven ist zu entnehmen, daß bei gleichen μg Mengen Sphingosinbasen die Farbtiefe der Reaktionsprodukte mit zunehmender Anzahl der Hydroxylgruppen der Aminobasen konstant, und zwar in der Reihenfolge: C_{18} -Sphingin (1 OH), C_{18} -Sphingosin (2 OH, 1=), C_{18} -Dihydrosphingosin (2 OH), C_{20} -Anhydrophytosphingosin und C_{20} -Phytosphingosin (3 OH) abnimmt. Ein zusätzlicher Einfluß der Doppelbindung der Aminobasen auf die Stärke des Farbkomplexes ist nicht ganz auszuschließen. Trotzdem kann die gesamte Bestimmung ohne große Beeinträchtigung der Genauigkeit vereinfacht werden, wenn man die der C_{18} -Sphingosineichkurve entnommenen Sphingosinwerte je nach der Zusammensetzung des analysierten Sphingosingemisches mit den im Versuchsteil angegebenen Umrechnungsfaktoren multipliziert.

Die modifizierte Methylorangemethode ermöglicht mit einer ausreichenden Genauigkeit die quantitative Bestimmung von etwa 7 - 8 μg C_{18} -Sphingosin (Extinktion etwa 0.1), 5 - 6 μg C_{18} -Sphingin (Extinktion etwa 0.1), 8 - 9 μg C_{18} -Dihydrosphingosin (Extinktion etwa 0.1) und etwa 30 μg C_{20} -Phytosphingosin (Extinktion etwa 0.1). Wie sich in Modellversuchen zeigen ließ, beträgt die Genauigkeit der modifizierten Methylorangemethode bei Bestimmung pflanzlicher Sphingosine $\pm 0.3\%$, bei Bestimmung tierischer Sphingosine etwa $\pm 1.0\%$. LAUTER⁵⁹⁾ konnte mit der von ihm angegebenen Methode 104.5% der im Modellversuch eingesetzten tierischen Sphingosine wiederfinden. Ein gleicher Versuch mit der von uns modifizierten Methylorangemethode erbrachte ein Ergebnis von 101.8% (Tab. 4, S.24). Die verschiedenen sauren Hydrolysemethoden haben keinen sichtbaren Einfluß auf die quantitative Sphingosinbestimmung. Die Methylorangemethode, die einfach und rasch durchführbar ist, dürfte sich vor allem sehr gut für Reihenuntersuchungen eignen. Obwohl die modifizierte Methylorangemethode den allgemeinen Anforderungen genügt, war eine spezifischere Methode schon deshalb wünschenswert, weil bei der Reaktion des Methyloranges keine für die Sphingosine charakteristischen funktionellen Gruppen erfaßt werden.

Am naheliegendsten war die Umsetzung der Amidgruppe des Sphingosins mit Dinitrofluorbenzol.

Wir bedienten uns der D i n i t r o f l u o r b e n z o l - m e t h o d e von ROBBINS⁶⁰⁾⁶¹⁾ und AXELROD⁶²⁾. Wir modifizierten diese Methode, die ursprünglich von ROBBINS zur Bestimmung serin- oder äthanolaminhaltiger Esterphosphatide ausgearbeitet worden war, indem wir die Sphingosine aus dem alkalisierten, lipoidfreien Hydrolysat quantitativ extrahierten, um störende stickstoffhaltige Substanzen auszuschalten. Außerdem benützten wir spezifische Eichkurven. Damit war eine exaktere Bestimmung der meisten Sphingosine möglich.

Das Wirkungsoptimum der Reaktion wird bei einem pH von 9.0 durch 30-minütiges Erhitzen des Analysenansatzes auf etwa 60°C und bei einer Konzentration von 4.5 - 5 mM FDB und 0.08-0.4 mM

Lipid erreicht. Um den Einfluß des in Nebenreaktion entstehenden Dinitrophenols auszuschalten, darf die spektrophotometrische Bestimmung des 2,4-Dinitrophenylsphingosins nicht beim Absorptionsmaximum 360 m μ , sondern erst bei 420 m μ vorgenommen werden. Diese Maßnahme beeinträchtigt die Genauigkeit der Bestimmung nicht.

Die Genauigkeit der modifizierten Dinitrofluorbenzolmethode beträgt bei der Bestimmung pflanzlicher Sphingosine etwa 1%, bei der Bestimmung tierischer Sphingosine etwa 0.5%. Nach der Robin'schen Versuchsanordnung können nur etwa 93% der im Versuch eingesetzten, mit der von uns modifizierten Dinitrofluorbenzolmethode dagegen 98.25 - 99% der errechneten Sphingosine des Candidacerebrins und 100.5% der im Modellversuch eingesetzten tierischen Sphingosine wiedergefunden werden (Tab. 4, S. 24). Mit der modifizierten Methode ließen sich noch 22 μ g C₁₈-Sphingosin bzw. 35 μ g C₂₀-Phytosphingosin (Extinktion 0.1) erfassen.

Vergleichsweise zogen wir auch noch die N i n h y d r i n - r e a k t i o n heran, die COCKING⁶³⁾ und WHEELDON⁶⁴⁾ zur spektrophotometrischen Bestimmung stickstoffhaltiger Esterphosphatide sowie deren Basen verwendeten.

Wir bestimmten die nach Spaltung der Sphingolipide aus dem Hydrolysat isolierten Sphingosine ähnlich wie bei der Methyloarangemethode und der Dinitrofluorbenzolmethode mit verschiedenen Eichkurven. Die Zusammensetzung des Sphingosinbasengemisches war für die Auswahl der entsprechenden Eichkurve ausschlaggebend. Entscheidend ist bei der Anwendung der Ninhydrinmethode der vollkommene Ausschluß aller anderen ninhydrinpositiven, stickstoffhaltigen Verbindungen und die Durchführung der Reaktion in hermetisch abgeschlossenen, nicht zu großen Reaktionsgefäßen. Die s p e k t r o p h o t o m e t r i s c h e A u s m e s s u n g d e s N i n h y d r i n - S p h i n g o s i n - F a r b k o m p l e x e s erfolgte bei 570 m μ .

Bei genauer Einhaltung der im experimentellen Teil aufgeführten Versuchsbedingungen ergibt die Ninhydrinmethode hinreichend

genaue Werte und läßt die Bestimmung von minimal 15 - 17 μg C_{18} -Sphingosin bzw. 57 - 60 μg C_{20} -Phytosphingosin (Extinktion etwa 0.1) zu. 99.8 - 105.5% der pflanzlichen und 89.5 - 99.8% der tierischen, im Probeversuch eingesetzten Sphingosine (Tab. 4, S.24) ließen sich mit der Ninhydrinmethode wiederfinden. Wie ein Vergleich der quantitativen Sphingosinbestimmung des Erdnußphytoglykolipids, des Candidacerebrins und der Rinderhirncerebroside zeigt (Tab. 5, S.24), gelangt man mit jedem der drei beschriebenen spektrophotometrischen Verfahren zu befriedigenden und untereinander gut übereinstimmenden Ergebnissen. Das Methylorangeverfahren besitzt von allen die größte Empfindlichkeit.

Mit der Methylorangemethode ermittelten wir im Erdnußphytoglykolipid einen Sphingosingehalt von 20.95%, mit der Dinitrofluorbenzolmethode einen von 24.96% und mit der Ninhydrinmethode einen von 20.17%. Der Sphingosingehalt der Candidacebrebrine ließ sich mit der Methylorangemethode zu 47.7%, mit der Dinitrofluorbenzolmethode zu 45.1% und mit der Ninhydrinmethode zu 47.4% und der der Rinderhirncerebroside zu 39.63% und 39.56% und 39.52% bestimmen (Tab. 5, S.24 und Tab. 28, S.106). Die zur Spaltung der Sphingolipide eingesetzten sauren Hydrolysenmethoden haben auf keine der drei diskutierten Bestimmungsverfahren einen merklichen Einfluß.

T a b e l l e 4

Die quantitative Bestimmung von reinen Sphingosinen
Modellversuche

	Methylenorange- methode	Dinitrofluor- benzolmethode	Ninhydrin- methode
Sphingosine, gef.	%	%	%
aus den Cerebrinen einer Hefe	100.66 101.35	99.0	102.0
aus den Cerebrinen einer Hefe + C ₂₀ -Phytosphingosin	100.40 97.00	98.25 99.00	101.1 99.8 102.0 105.5
% Mittelwert + mittl. Fehler d.Mittelwertes	100.3 ± 1.05	98.81 ± 0.87	102.05 ± 0.27
aus den Cerebrosiden des Rinderhirns + C ₁₈ -Sphingosin	102.0 101.2 102.3	103.0 98.0	97.8 99.8 89.5 93.5
% Mittelwert + mittl. Fehler d.Mittelwertes	101.5 ± 0.12	100.5 ± 2.5	95.15 ± 2.05

T a b e l l e 5

Ergebnis der quantitativen Sphingosinbestimmung des Erdnußphytoglyko-
lipids, des Candidacerebrins, der Candida- und Saccharomycesmykoglyko-
lipide und des Candidacerebrosids

Sphingolipid	Methylorange- methode	Dinitrofluor- benzolmethode	Ninhydrin- methode
	% Sphingosine	% Sphingosine	% Sphingosine
Erdnußphytoglykolipid	22.34 19.80 21.43	23.05 26.60 26.05	21.85 19.45 22.87
Candidacerebrin II FP. 135.4-137.7°C	47.7	45.10	47.40
Candidamykoglykolipid	32.11		
Saccharomycesmyko- glykolipid	31.75		
Candidacerebrosid	37.06		

7. a) Untersuchungen über die Sphingosine des Erdnußphytoglykolipids

Bisher sind nur die Sphingosine des Sojabohnen-, Mais- und Flachsphytoglykolipids sowie eines Cerebrosids aus Weizenmehl näher untersucht worden. Unter den häufiger vorkommenden Samenphytoglykolipiden der Gramineen und Leguminosen fehlte noch die Strukturaufklärung des Erdnußphytoglykolipids und der in ihm enthaltenen Sphingosine. Zwar existieren ältere Untersuchungen von MALKIN und POOLE⁶⁵⁾ über ein höhermolekulares, stickstoffhaltiges Inositid, doch erwies sich diese Verbindung später als ein Gemisch verschiedener Inositide und Esterphosphatide.

Die Reindarstellung des Erdnußphytoglykolipids nahmen wir nach einem von uns modifizierten, im Versuchsteil (s. 124) aufgeführten Verfahren vor. Dieses Phytoglykolipid war frei von Esterphosphatiden, Sterinen und Aminosäuren. Ein erster dünnschichtchromatographischer Vergleich der Sphingosine des Erdnußphytoglykolipids mit denen des Sojaphytoglykolipids ergab für beide Phytoglykolipide einander entsprechende Sphingosinkomponenten.

Wie aus dem D ü n n s c h i c h t c h r o m a t o g r a m m der E r d n u ß s p h i n g o s i n e (Abb. 6, S. 26 und Abb. 7, S. 27) hervorgeht, waren anhand von Vergleichssubstanzen Phytosphingosine (1) und Dehydrophytosphingosine (1), Dihydrosphingosin (2) und Anhydrophytosphingosin (5) nachzuweisen. Die Natur dreier weiterer ninhydrinpositiver Substanzen (3,4,6) war vorerst noch nicht zu klären. Da wir mit Sicherheit die Anwesenheit ninhydrinpositiver Verunreinigungen ausschließen konnten, war anzunehmen, daß es sich auch bei den im Chromatogrammschema mit den Zahlen 3,4 und 6 bezeichneten Basen (Abb. 6, S. 26) um Sphingosine oder ihre Derivate handelte. Ihrem R_F -Wert nach könnten sie mit threo-Sphingosin bzw. C_{18} - und C_{20} -Sphingin (Substanz 3) und mit dem O-Methyläther des Sphingosins (Substanz 4) identisch sein. Über die Struktur des Sphingosins mit dem R_F -Wert 0.72

(Substanz 6) war chromatographisch allein keine Aussage möglich.

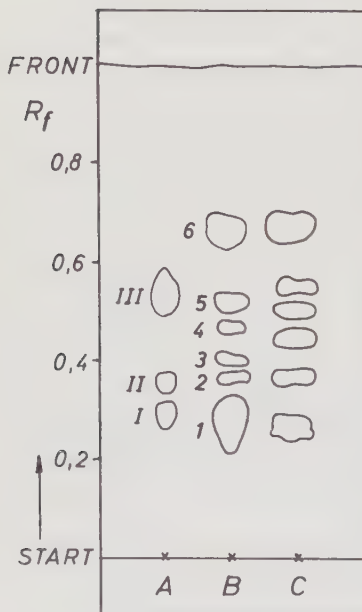


Abb. 6

Dünnschichtchromatographie der Sphingosine des Erdnußphytoglykolipids

Kieselgel-G

Fließmittel: CHCl_3 -MeOH- H_2O
(65:25:4)

A = Gemisch aus C_{20} -Phytosphingosin (I) + C_{18} -Dihydrosphingosin (II) + C_{18} -, C_{20} -Anhydrophytosphingosine (III)

B = Sphingosine aus Erdnußphytoglykolipid

C = Sphingosine aus Sojaphytoglykolipid

Zur Klärung ihrer Struktur wurden die Sphingosine des Erdnußphytoglykolipids einem oxydativen Abbau unterworfen und die Oxydationsprodukte mit Hilfe der Gas chromatographie analysiert.

Die durch Perjodsäureoxydation aus den Erdnußsphingosinen entstandenen drei Aldehyde Pentadecanal, Pentadecenal und Hexadecanal (Abb. 8, S. 28) sind dem C_{18} -Phytosphingosin, dem C_{18} -Dehydrophytosphingosin und dem C_{18} -Dihydrosphingosin zuzuordnen. Das ungesättigte Pentadecenal ließ sich zu Pentadecanal hydrieren.

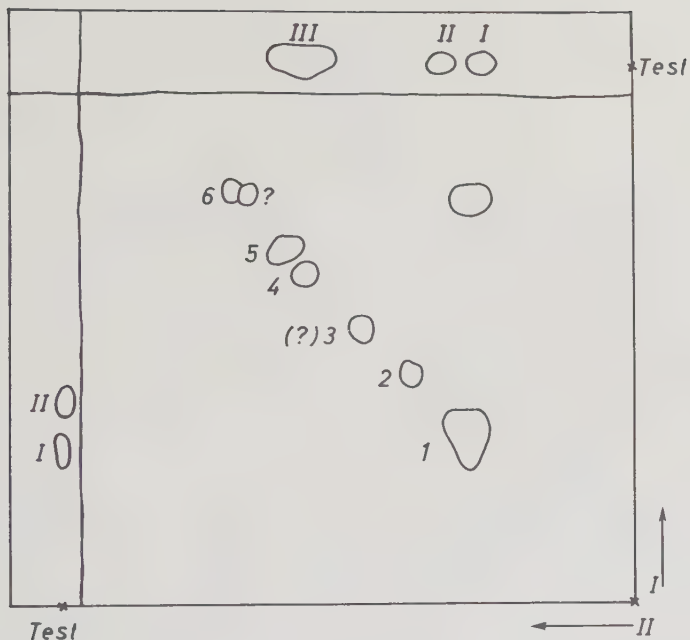


Abb. 7

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der Sphingosine des
Erdnußphytoglykolipids

Kieselgel-G; Fließmittel in beiden Richtungen: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$
(65:25:4)

- I = C_{20} -Phytosphingosin
- II = C_{18} -Dihydrosphingosin
- III = C_{18} -, C_{20} -Anhydrophytosphingosine

Abb. 8

Gaschromatographie der durch
Perjodsäureoxydation aus den
Sphingosinen des Erdnußphyto-
glykolipids erhaltenen Aldehyde
Chromatographie der Aldehyde
an einer Polyestersäule

- 1 = Pentadecanal
- 2 = Pentadecenal
- 3 = Hexadecanal

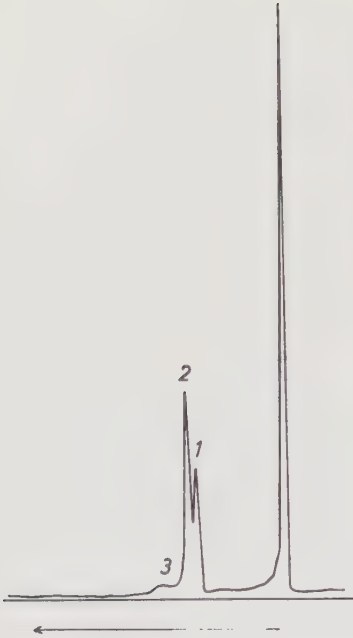
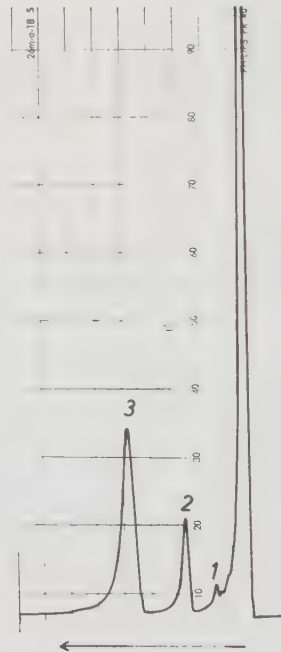


Abb. 9

Gaschromatographie der durch Chrom-
säureoxydation aus den Sphingosinen
des Erdnußphytoglykolipids erhalte-
nen Carbonsäuren

Chromatographie der Carbonsäure
an einer Apiezonssäule

- 1 = Glutarsäure
- 2 = Adipinsäure
- 3 = Caprinsäure

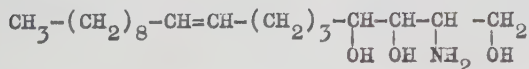


Weitere Aufschlüsse über die Struktur der einzelnen Sphingosine, insbesondere über die Lage der Doppelbindung im Dehydrophyto-sphingosin, erhielten wir durch die Gaschromatographie der beim C h r o m s ä u r e a b b a u aus den Aminobasen entstandenen Mono- und Dicarbonsäuren (Abb. 9, S. 28, Abb. 10, S.30). Die Zuordnung war folgende:

T a b e l l e 6

Nachgewiesene Carbonsäuren	Zuordnung
Pentadecansäure	C ₁₈ -Phytosphingosin
Myristinsäure	C ₁₆ -Dihydrosphingosin
Laurinsäure	C ₂₀ -Dehydrophytosphingosin (?)
	C ₂₀ -Dehydrosphingosin (?)
Caprinsäure	C ₁₈ -Dehydrophytosphingosin
	C ₁₈ -Dehydrosphingosin (?)
Adipinsäure	C ₁₈ -, C ₂₀ -Dehydrosphingosin (?)
Glutarsäure	C ₁₈ -Dehydrophytosphingosin
	C ₂₀ -Dehydrophytosphingosin (?)

Die aufgefundene Caprinsäure und Glutarsäure stellen Spaltproduk-te eines Dehydrophytosphingosins dar. Demnach handelt es sich bei dem Dehydrophytosphingosin des Erdnußphytoglykolipids ver-mutlich um ein 2-Amino-1,3,4-trihydroxy-8-octadecen nachstehen-der Formel:



Die Anzahl der OH-Gruppen, die Stellung der OH- und NH₂-Grup-pen, die Kettenlänge und die Lage der Doppelbindung des Dehydro-phytosphingosins des von uns isolierten Erdnußphytoglykolipids ist die gleiche wie bei der von PROSTENIK³⁷⁾ kürzlich aus Erd-nußphosphatiden isolierten, ungesättigten Phytosphingosinbase, die die Struktur eines trans-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-8-octa-decens besitzen soll. Es ist anzunehmen, daß beide Basen die

gleiche Stereochemie besitzen. Außerdem dürften beide Basen strukturgleich mit der von CARTER³⁵⁾ aus Flachsphtoglykolipid gewonnen Sphingosinbase sein. Bei dieser handelt es sich um ein D-ribo-1,3,4-Trihydroxy-2-amino-8-trans-octadecen.

Die Anwesenheit des C₁₈-Phytosphingosins im Erdnußphytoglykolipid wurde durch den Nachweis des Pentadecanals und der Pentadecansäure bestätigt.

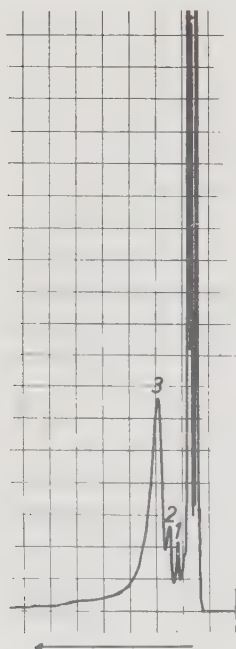


Abb. 10

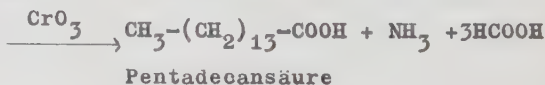
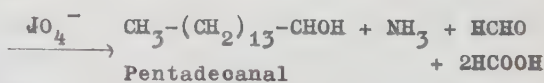
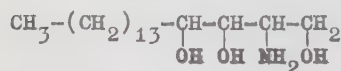
Gaschromatographie der durch Chromsäureoxydation aus den Sphingosinen des Erdnußphytoglykolipids erhaltenen Carbonsäuren

Chromatographie der Carbonsäuren an einer Apiezonssäule

- 1 = Laurinsäure
- 2 = Myristinsäure
- 3 = Pentadecansäure

Schema der Perjodsäure- und Chromsäureoxydation der Erdnuß-sphingosine:

C₁₈-Phytosphingosin:



hydrophytosphingosin machen ebenso wie bei dem Sojaphytoglykolipid den Hauptanteil des Sphingosingemisches des Erdnußphytoglykolipids aus. Die Phytosphingosine sind in beiden Fällen von dem in geringerer Konzentration vorhandenen C₁₈-Dihydrosphingosin begleitet. Das prozentuale Verhältnis Phytosphingosine-Dehydrophytosphingosine ist wie die Tabelle 7 zeigt, bei Erdnuß- und Sojaphytoglykolipiden verschieden.

T a b e l l e 7

Die Hauptkomponenten des Sphingosinbasengemisches des Erdnußphytoglykolipids und verschiedener anderer Phytoglykolipide

Phytoglykolipide	% C ₁₈ -Phytosphingosin	% C ₁₈ -Dehydrophytosphingosin
Erdnußphytoglykolipid	40.06	59.65
Flachsphytoglykolipid ³⁵⁾	15	85
Sojaphytoglykolipid ³⁵⁾	20	80
Maisphytoglykolipid ³⁵⁾	90	10

Während das Phytosphingosin-Dehydrophytosphingosinverhältnis bei den Erdnußphytoglykolipiden sich auf etwa 1:1.5 beläuft, beträgt es bei den Flachsphytoglykolipiden etwa 1:6, beim Sojaphytoglykolipid 1:4 und beim Maisphytoglykolipid 9:1 (Tab. 7).

Wie CARTER³⁵⁾ bei seinen Untersuchungen an Flachs- und Maisphytoglykolipiden feststellen konnte, scheint die quantitative Basenzusammensetzung für das jeweilige Phytoglykolipid charakteristisch zu sein.

b) Untersuchungen über die Sphingosine des Hefecerebrins

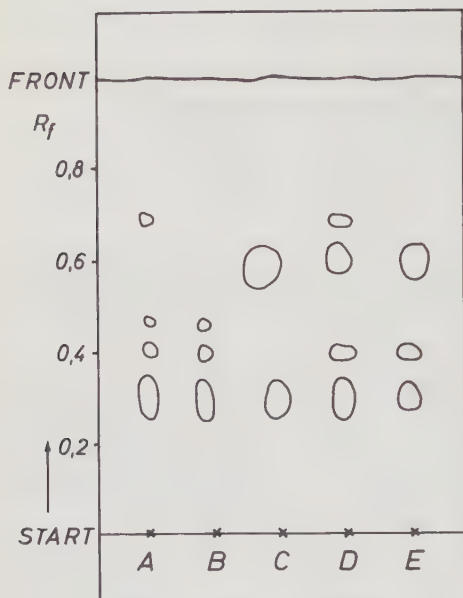
Ein Hinweis von SWEETLEY⁴⁰⁾ über die Anwesenheit von Dihydrosphingosin in Hefephosphatiden und die widersprüchlichen Beobachtungen verschiedener Autoren³²⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾ über die Zusammensetzung der Hefecerebrinsphingosine veranlaßten uns zu einer

erneuten Untersuchung. Mit Hilfe der im Versuchsteil (S. 151) angegebenen Methoden konnten wir aus *Candida*- und *Saccharomyces*-hefe eine Sphingolipidfraktion gewinnen, die sich wieder in eine Cerebrin-, Cerebrosid- und Mykoglykolipidfraktion auf-trennen ließ. Die Untersuchungen nahmen wir in der bei den Erdnußsphingosinen beschriebenen Weise vor.

Zur Analyse kamen drei von insgesamt vier aus einem techni-schen *Candida*cerebrin nach verschiedenen Methoden hergestellte Cerebrinpräparate (Cerebrin I, II und IV), die unter anderem unterschiedliche Schmelzpunkte besaßen. Cerebrin III glich dem Cerebrin II. Ein weiteres Cerebrin (Cerebrin V) wurde aus *Candida*hefe durch Säulenchromatographie isoliert (Gewinnung der Cerebrine siehe Versuchsteil S. 164).

D ü n n s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i s c h (Abb. 11) konnten wir in den Hefecerebrinen Phytosphingosine ($R_f = 0.27$) und Dihydrosphingosine ($R_f = 0.37$) nachweisen. Als Artefakt war außerdem noch das bei der sauren Hydrolyse des Cerebrins gebil-dete Anhydrophytosphingosin ($R_f = 0.55$) sichtbar.

Abb. 11



Dünnschichtchromatographie
der Sphingosine der Cere-
brine der *Candida utilis*-
Hefe

Kieselgel-G

Fließmittel: CHCl_3 -MeOH- H_2O
(65:25:4)

A = Sphingosine aus Candi-
dacerebrin I
(barytalkalische Hydro-
lyse)

B = Sphingosine aus Candi-
dacerebrin II
(barytalkalische Hydro-
lyse)

C = Sphingosine aus Candi-
dacerebrin IV
(saure Hydrolyse)

D = Sphingosine des aus
Candida-Hefe isolierten
Cerebrins (saure Hydro-
lyse)

E = C_{20} -Phytosphingosin + C_{18} -Dihydrosphingosin + C_{18} -, C_{20} -An-
hydrophytosphing.

Die durch Oxydation mit Chrom- und
Perjodsäure entstandenen drei Carbonsäuren, Hepta-
decansäure, Hexadecansäure und Pentadecansäure und die ent-
sprechenden drei Aldehyde Heptadecanal, Hexadecanal und Penta-
decanal sind die Oxydationsprodukte des C_{20} -Phytosphingosins,
des C_{18} -Dihydrosphingosins und des C_{18} -Phytosphingosins (Abb.
12 u. Abb. 13, S.35).

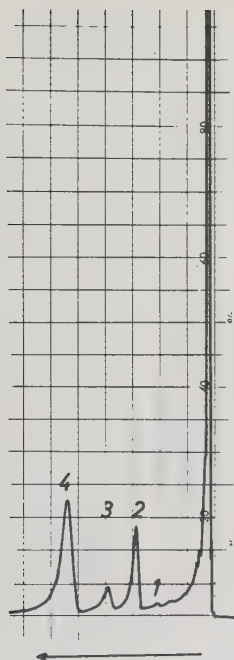


Abb. 13

Gaschromatographie der durch Chromsäureoxydation aus den Sphingosinen der Candidacerebrine erhaltenen Carbonsäuren

Chromatographie der Carbonsäuren an einer Apiezonssäule

- 1 = Tetradeconsäure
- 2 = Pentadeconsäure
- 3 = Hexadeconsäure
- 4 = Heptadeconsäure

Abb. 12

Gaschromatographie der durch Perjod-säureoxydation aus den Sphingosinen der Candidacerebrine erhaltenen Aldehyde

Chromatographie der Aldehyde an einer Polyestersäule

- 1 = Tetradeccanal
- 2 = Pentadeccanal
- 3 = Hexadeccanal
- 4 = Heptadeccanal



Da bei den Oxydationen keine ungesättigten Aldehyde und keine Dicarbonsäuren entstanden waren und sich die Zusammensetzung des Sphingosingemisches nach der Hydrierung nicht änderte, konnten keine ungesättigten Sphingosine vorliegen. Aus den Gaschromatogrammen der durch Perjodsäureoxydation erhaltenen Aldehyde ergab sich für die verschiedenen Hefecerebrine folgende Verteilung der Sphingosinbasen (Tab. 8).

T a b e l l e 8

Zusammensetzung des Sphingosinanteils verschiedener, aus einem technischen Torulacerebrin gewonnener Cerebrinpräparate

Cerebrine	C ₂₀ -Phyto- sphingosin %	C ₁₈ -Phyto- sphingosin %	C ₁₈ -Dihydro- sphingosin %
I (135-136.5°C)	58.75	25.05	16.22
II (135.4-137.7°C)	60.25	28.75	11.32
IV (144-145°C)	68.00	29.10	6.00

Das Cerebrin V (Smp. 139-140°C) weist qualitativ die gleiche Zusammensetzung auf wie die aus dem technischen Candidacerebrin isolierten Cerebrine.

Damit konnte die Zusammensetzung der Candidacerebrinsphingosine und die Herkunft des von SWEeley und MOSCATELLI⁴⁰⁾ in den Hefephosphatiden beobachteten Dihydrosphingosins geklärt werden. Bei dem von SWEeley und MOSCATELLI beobachteten Dihydrosphingosin handelt es sich um das C₁₈-Dihydrosphingosin.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, äußern sich die verschiedenen Cerebrinschmelzpunkte in einer unterschiedlichen quantitativen Zusammensetzung ihrer Sphingosinanteile. So bestehen beispielsweise die Sphingosine des Candidacerebrins I (Smp. 135-136.5°C) zu 16.22% aus C₁₈-Dihydrosphingosin, die des Candidacerebrins IV (Smp. 144-145°C) zu 6% aus C₁₈-Dihydrosphingosin. Ähnliche

Unterschiede sind auch bei den C_{18} - und C_{20} -Phytosphingosinwerten festzustellen. Für diese Abweichung kann vorerst, da eine Verunreinigung der Hefecerebrine durch andere Hefesphingolipide ausgeschlossen werden kann, keine Erklärung gegeben werden. Unabhängig davon unterliegen, wie alle in der Literatur aufgeführten Werte beweisen, die Konzentrationen an C_{18} -Phytosphingosin und C_{20} -Phytosphingosin erheblichen Schwankungen (Tab. 9).

T a b e l l e 9

Literaturwerte über die prozentuale Verteilung der C_{18} - und C_{20} -Phytosphingosine in den Hefecerebrinen

	C_{18} -Phyto- sphingosin %	C_{20} -Phyto- sphingosin %	Literatur
Hefecerebrin	35.0	65.0	KISIC und PROSTENIK ⁶⁷⁾
Hefecerebrin	66.6	33.3	ODA und KAMJIA ⁶⁶⁾

Die Hauptgründe für diese Schwankungen dürften in der biologischen Schwankungsbreite des Untersuchungsmaterials sowie in der art- und gattungsbedingten Herkunft der Hefen bzw. in einem Einfluß der Kulturbedingungen der Hefen auf die Biosynthese der Lipide und Sphingolipide und ihrer Aminobasen zu suchen sein.

c) Untersuchungen über die Sphingosine der Mykoglykolipide aus Candida- und Saccharomyceshefe

Die Analyse des Basenanteils der aus Candida- und Saccharomyceshefe isolierten, in ihrer Struktur wahrscheinlich identischen Mykoglykolipide mit den bekannten dünn- und gaschromatographischen Methoden (Abb. 14 u. 15, S. 38 und Abb. 16, S. 39) ergab wiederum die Anwesenheit der drei, bereits im Hefecerebrin enthaltenen Sphingosine, C_{18} - und C_{20} -Phytosphingosin und C_{18} -Dihydrosphingosin. Ungesättigte Sphingosine fehlten.

Abb. 14

Dünnschichtchromatographie
der Sphingosine der Hefe-
mykoglykolipide

Kieselgel-G

Fließmittel: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$
(65:25:4)

- A = Sphingosine aus Candida-
mykoglykolipid
- B = Sphingosine aus Saccharo-
mycesmykoglykolipid
- C = Sphingosine aus Erdnuß-
phytoglykolipid.
- D = C_{20} -Phytosphingosin +
 C_{18} -Dihydrosphingosin +
 C_{18} -, C_{20} -Anhydrophyto-
sphingosin

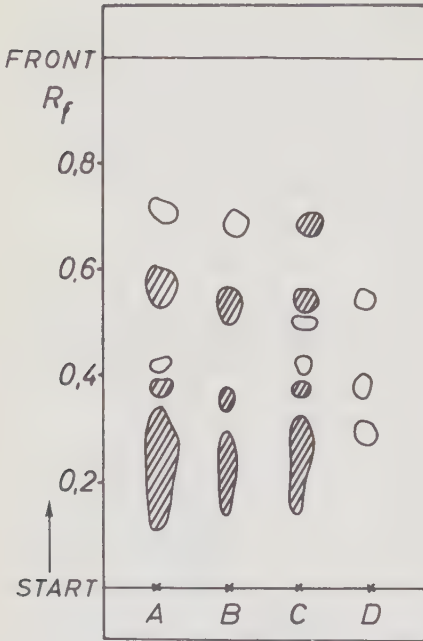


Abb. 15

Gaschromatographie der durch Perjod-
säureoxydation aus den Sphingosinen
des Saccharomycesmykoglykolipids erhal-
tenen Aldehyde

Chromatographie an einer Polyestersäule

- 1 = Pentadecanal
- 2 = Hexadecanal
- 3 = Heptadecanal



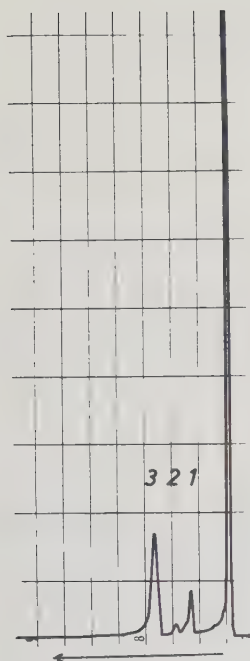


Abb. 16

Gaschromatographie der durch Perjod-
säureoxydation aus den Sphingosinen
des Candidamykoglykolipids erhaltenen
Aldehyde

Chromatographie der Aldehyde an einer
Polyestersäule

- 1 = Pentadecanal
- 2 = Hexadecanal
- 3 = Heptadecanal

Die prozentuale Verteilung der drei Basen in den Mykoglyko-
lipiden ist folgende:

T a b e l l e 10

Zusammensetzung des Sphingosinanteils der Hefemykoglykolipide

Mykoglykolipide	C ₂₀ -Phyto- sphingosin %	C ₁₈ -Phyto- sphingosin %	C ₁₈ -Dihydro- sphingosin %
Candidamykolyko- lipid	70.02	20.9	8.8
Saccharomyces- mykoglykolipid	56.1	33.5	10.6

Wie schon im Falle der Erdnuß- und Sojaphytoglykolipide und der Hefecerebrine treten auch bei den Mykoglykolipiden herkunftsbedingte charakteristische Unterschiede in der quantitativen Verteilung der Hauptkomponenten des Sphingosingemisches, der C_{18} - und C_{20} -Phytosphingosine, auf (Tab. 10, S.39).

d) Untersuchungen über die Sphingosine des Cerebrosids aus *Candida utilis*

Die Sphingosine des aus Candidahefe isolierten Cerebrosids (Isolierung des Cerebrosids siehe Versuchsteil S.169) wichen, wie die später diskutierten Untersuchungsergebnisse zeigen, dadurch von den Sphingosinen der Cerebrine und der Mykoglykolipide der gleichen Hefen ab, daß der Hauptanteil des Cerebrosidgemisches nicht von Phytosphingosinen, sondern von C_{18} -Dihydrosphingosin gebildet wird. Außerdem fehlten die für die pflanzlichen Sphingolipide typischen Phytosphingosine vollkommen. Auch die restlichen, noch nicht völlig identifizierten Sphingosine des Candidacerebrosids scheinen in ihrer Struktur eher den Sphingosinbasen der tierischen als der pflanzlichen Sphingolipide ähnlich zu sein. Insgesamt entspricht die Basenzusammensetzung des Candidacerebrosids mehr dem eines tierischen Sphingolipids als dem eines Sphingolipids aus Mikroorganismen.

Unsere experimentellen Befunde weisen außer auf das Vorkommen mehrerer Dihydrosphingosine mit verschiedenen Kettenlängen (C_{16} -, C_{18} -Dihydrosphingosin) auf die Anwesenheit einer ungesättigten Sphingosinbase hin, deren Struktur wegen Substanzmangel nicht näher untersucht werden konnte.

Ein Vergleich der Sphingosine des Candidacerebrosids mit denen eines Rinderhirncerebrosids ergibt, daß beide Sphingosingemische ein überraschend ähnliches dünn schichtchromatographisches Bild (Abb. 17, S.41) aufweisen. Die Dihydrosphingosine und O-Methyläther der Sphingosine können auf dem Dünnschichtchromatogramm einwandfrei identifiziert werden. Das Sphingosin mit ungesättigtem Charakter besitzt den R_f -Wert eines C_{18} - oder C_{20} -Sphingosins (2-Amino-1,3-dihydroxy-trans-4-octadecen oder eicosen) und ist hydrierbar.

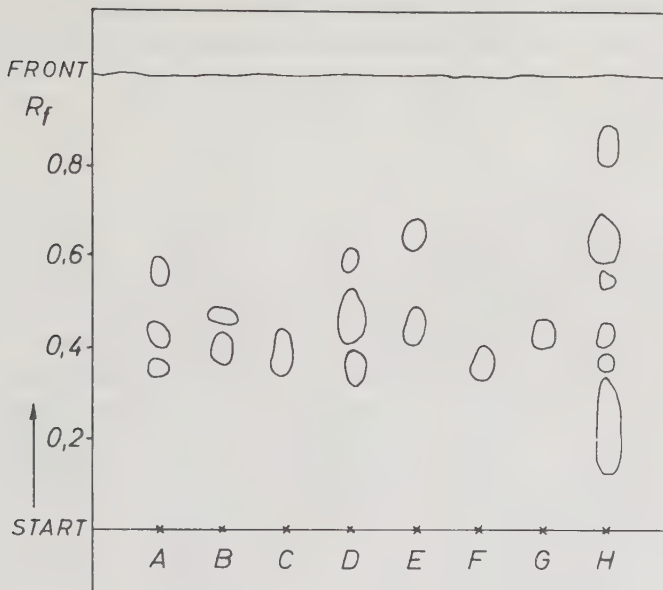


Abb. 17

Dünnschichtchromatographie der Sphingosine des Candidacerebrosids
Kieselgel-G; Fließmittel: CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4)

- A = Sphingosine des Candidacerebrosids
- B = Sphingosine des Candidacerebrosids, hydriert
- C = Sphingosine des Candidacerebrosids, hydriert +
 C_{18} -Dihydrosphingosin
- D = Sphingosine aus Rinderhirnsphingolipiden
- E = C_{18} -Sphingosin, synthet.
- F = C_{18} -Dihydrosphingosin
- G = C_{18} -Sphingolipin
- H = Sphingosine des Erdnußphytoglykolipids

Die trans-Doppelbindung bei 10.3 μ im IR-Spektrum des Candidacerebrosids spricht für die Existenz eines ungesättigten Sphingosins.

Die Chromsäureoxydation der Candidacerebroside sphingosine lieferte im Gaschromatogramm (Abb. 18) Glutarsäure (1), Adipinsäure (2), Laurinsäure (3), Myristinsäure (4), Palmitinsäure (5) und Heptadecansäure (6).

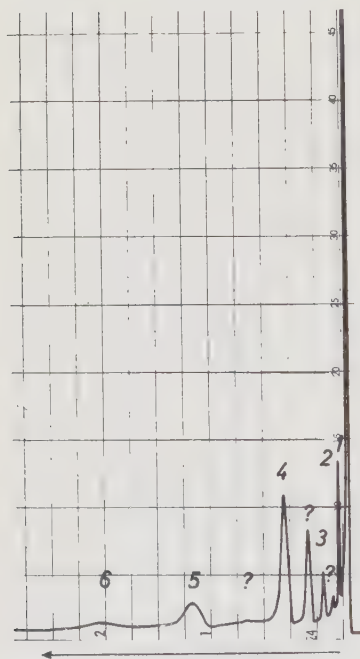


Abb. 18

Gaschromatographie der durch Chromsäureoxydation aus den Sphingosinen des Candidacerebroside erhaltenen Carbonsäuren
Chromatographie der Carbonsäure an einer Apiezonssäule

Die Myristinsäure ist dem C_{16} -Dihydrosphingosin und die Palmitinsäure dem C_{18} -Dihydrosphingosin zuzuordnen. Die Laurinsäure könnte allein aus einem C_{14} -Dihydrosphingosin entstanden sein oder zusammen mit der Adipinsäure einem C_{20} -Dehydrosphingosin entstammen. Die Myristinsäure kommt als Spaltstück eines C_{18} -Sphingosins in Frage. Die noch nachweisbare Glutarsäure und Heptadecansäure läßt sich nicht zuordnen. Die Gaschromatographie bestätigt damit, daß der Sphingosinanteil des Hefecerebroside zur Hauptsache aus C_{18} - und C_{16} -Dihydrosphingosin besteht.

Sie zeigt, daß das Candidacerebroside über einen ähnlich strukturierten Sphingosinanteil verfügt wie die Rinderhirncerebroside (Abb. 19)

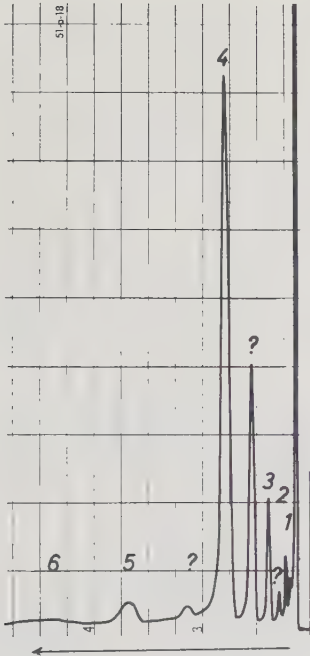


Abb. 19

Gaschromatographie der durch Chromsäureoxydation aus den Sphingosinen der unveresterten Rinderhirncerebroside erhaltenen Carbonsäuren

Chromatographie der Carbonsäuren an einer Apiezonsäule

- 1 = Glutarsäure
- 2 = Adipinsäure
- 3 = Laurinsäure
- 4 = Myristinsäure
- 5 = Palmitinsäure
- 6 = Heptadecansäure

B. Die Untersuchung des Erdnußphytoglykolipidkomplexes

Nachweis, Isolierung und Strukturaufklärung des Erdnußphytoglykolipidkomplexes.

1. Bisherige Kenntnisse über ein Phytoglykolipid aus Erdnußsamen

Bei dem von MALKIN und POOLE⁶⁵⁾ aus den Gesamtphosphatiden der Erdnuß isolierten Inositid sollte es sich nach den Angaben der Autoren um ein N-Glykosylderivat des Äthanolaminesters des Phosphatidylinositphosphats handeln. An Zuckern sollten pro Mol Inositid 2 Mole L-Arabinose und ein Mol D-Galaktose und an Fettsäuren Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure enthalten sein.

Diesem Befund von MALKIN und POOLE⁶⁵⁾ stand die Beobachtung von CARTER⁶⁸⁾ gegenüber. CARTER isolierte aus den Erdnußsamen ein komplexes Glykolipid, das große Ähnlichkeiten mit einem Phytoglykolipid erkennen ließ, wie es von ihm bereits aus Mais, Flachs, Sojabohne, Baumwollsaat, Sonnenblumenkernen und Weizen isoliert worden war⁶⁸⁾. Diese Widersprüche veranlaßten uns zu einer eingehenden Überprüfung der bereits vorliegenden Ergebnisse.

2. Qualitativer Nachweis des Erdnußphytoglykolipids

Bei der chromatographischen Trennung der Erdnußphosphatide auf formaldehydimprägniertem Chromatogrammpapier⁶⁹⁾ im Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5; Oberphase) entdeckten wir im Chromatogramm eine mit Rhodamin-B-Lösung⁷⁰⁾, Nilblaulösung⁷⁰⁾⁷¹⁾ und Ammoniummolybdat-Perchlorsäurereagens⁷²⁾ anfärbbare Substanz, deren R_f -Wert mit dem eines authentischen Sojaphytoglykolipids übereinstimmte.

Dieser Nachweis gelang, im Gegensatz zu den bekannten niedermolekularen Sphingolipiden, wie Cerebrosiden, Cerebrinen und Anhydrocerebrinen, die erst angereichert werden müssen, bereits aus dem rohen Erdnußphosphatidextrakt. Das im R_f -Bereich 0.28-0.14 liegende Erdnußphytoglykolipid, das sich offenbar aus mehreren Komponenten zusammensetzt, trennte sich gut von den begleitenden Esterphosphatiden ab (Abb. 20, S.45).

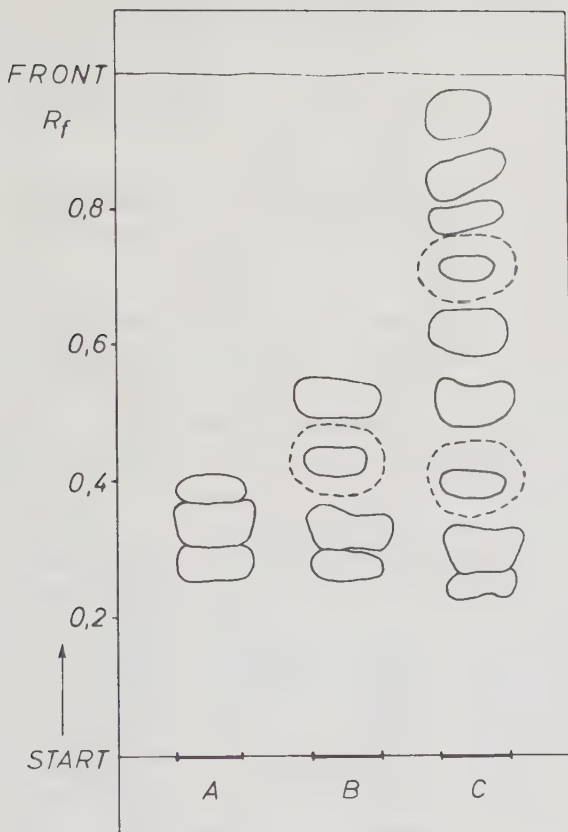


Abb. 20

Papierchromatographische Trennung der Erdnußphosphatide
Aufsteigende Chromatographie auf Formaldehyd-imprägniertem Papier
Fließmittel: n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)
Anfärbereagens: Nilblaulösung

- A = Erdnußphytoglykolipid II
- B = Inositidfraktion aus Erdnußlecithin
- C = Erdnußgesamtphosphatide

3. Isolierung des Erdnußphytoglykolipidkomplexes

Zur Isolierung der Erdnußphytoglykolipide verwendeten wir zwei Verfahren

1. das Verfahren der alkalischen Verseifung von Phosphatidgesamtextrakten oder deren Fraktionen⁶⁸⁾³⁸⁾⁷³⁾
und
2. die von CARTER³⁸⁾ u.a. beschriebene und zur Phosphatidtrennung bereits mehrfach erprobte Gegenstromverteilungsmethode.

Durch direkte 24-stündige bzw. 48-stündige Verseifung eines Erdnußhandelslecithins erhielten wir die Erdnußphytoglykolipidfraktionen I und II. Eine 3. Fraktion (III) gewannen wir durch 24-stündige alkalische Verseifung einer aus dem Handelslecithin isolierten Folch-I-Fraktion. Schließlich kam noch ein Präparat (IV) zur Untersuchung, das wir durch alkalische Verseifung einer Inositidfraktion, bestehend aus Monophosphoinositid, Lyso-monophosphoinositid, Phosphatidylserin und Phytoglykolipid, erhielten. Erdnußphytoglykolipid V stellten wir durch Gegenstromverteilung der aus dem Handelslecithin gewonnenen Inositidfraktion her. Zur Gewinnung des Erdnußphytoglykolipids VI extrahierten wir aus handelsüblichen Erdnußsamen die Phosphatide und isolierten aus ihnen nach der Methode von FOLCH⁷⁴⁾ eine inositidreiche Fraktion (Folch-I-Fraktion), die wir alkalisch verseiften.

Zur Reinigung wurden die Phytoglykolipide mit Alkohol aus ihrer Pyridinlösung ausgefällt bzw. in Chloroform-Alkohol oder in Wasser suspendiert und mit Alkohol aus der Suspension ausgefällt. Vereinzelt wurden die alkalischen wässrigen Lösungen dialysiert. Der größte Teil des aus den Gesamtposphatiden des Handelslecithins durch 24-stündige Hydrolyse gewonnenen Phytoglykolipids I war pyridinunlöslich. Die Reinigung erfolgte durch wiederholte Suspension der Phytoglykolipide in Gemischen von wassergesättigtem Chloroform-95%-igem Alkohol. Phytoglykolipide II, IV und V waren in Pyridin gut löslich und konnten unter Anwendung der Pyridin-Äthanolmethode gereinigt werden. Die Inositide erhielten wir durch Eisessigextraktion eines Gesamtposphatidextraktes.

Die Abb. 21 zeigt, daß die Präparate I - IV chromatographisch weitgehend übereinstimmen. Von diesen unterscheidet sich das Erdnußphytoglykolipid V (Abb. 21.)

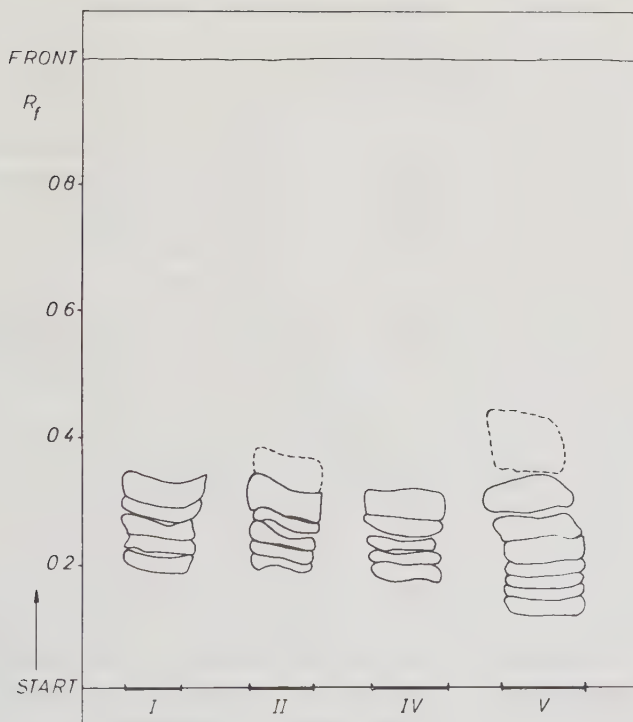


Abb. 21

Papierchromatographie der Erdnußphytoglykolipidkomplexe I, II, IV, V
Aufsteigende Chromatographie auf Formaldehyd-imprägniertem Papier

Fließmittel: n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

Anfärbereagens: Rhodamin-B-Lösung

4. Strukturaufklärung des Erdnußphytoglykolipidkomplexes

Den Hauptteil der Untersuchungen führten wir an den Erdnußphytoglykolipidkomplexen IV und V durch.

Wie die papierchromatographische Untersuchung zeigte, stellten die einzelnen Phytoglykolipidpräparate Gemische dar. Die Präparate I - IV setzten sich aus mindestens 5 verschiedenen Komponenten zusammen, die im R_f -Bereich von 0.28 - 0.14 liegen (Abb. 21, S. 47). Zone I stellte die Hauptkomponente der Phytoglykolipidkomplexe dar. Demgegenüber bestand der Hauptanteil des Erdnußphytoglykolipids V (Abb. 21) aus 2 Komponenten (2 + 3) im R_f -Bereich von 0.28 - 0.22. Eine Komponente (1) befand sich im R_f -Bereich 0.34 - 0.28 und noch mehrere Komponenten (4 - 7) im R_f -Bereich 0.20 - 0.14.

Auch in quantitativer Hinsicht unterschieden sich die Präparate I - IV von V. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile wurden über ihr Phosphat nach der Methode von WAGNER⁷⁵⁾⁷⁶⁾ bestimmt. Während die Phytoglykolipidkomponenten der Präparate I, II, III, IV eine annähernd gleiche quantitative Zusammensetzung aufwiesen, wich die prozentuale Verteilung der Komponenten von Präparat V deutlich ab.

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Komponenten der Erdnußphytoglykolipide I - IV ist folgende: Zone 1: 42.9 - 50.9%; Zone 2: 11.7 - 14.9%; Zonen 3 + 4 + 5: 31.9 - 43.4%. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Komponenten des Erdnußphytoglykolipids V konnte wie folgt bestimmt werden: Zone 1: 21.8 - 22.6%; Zone 2: 38.4 - 42.0%; Zone 3: 14.95%; Zonen 4 - 7: 14.4 - 18.8%.

Der nach quantitativer Papierchromatographie bestimmte Gesamtphytoglykolipidgehalt betrug bei den Erdnußsamen 0.075%, bei dem Erdnußphosphatidextrakt 9.25% und beim Erdnußhandelslecithin 6.75%.

Zur weiteren Charakterisierung der Erdnußphytoglykolipidkomplexe bestimmten wir deren Stickstoff-, Phosphor- und Aschengehalt (Tabelle 11).

T a b e l l e 11

Der Stickstoff-, Phosphor- und Aschegehalt der Erdnußphytoglykolipide

Phytoglykolipide	% Asche	% N	% P
I pyridinunlöslicher Teil	8.95	1.84	2.10
II 2mal aus Pyridin ausgefällt	5.43	1.99	1.98
IV	6.35- 6.75	2.17	1.98
V	5.05	2.10	2.12

Bemerkenswert ist der hohe A s c h e g e h a l t des Erdnuß-phytoglykolipidkomplexes. Je nach Vorbehandlung der Erdnußphytoglykolipide schwankte er in den Grenzen von 5.05 - 8.95%. Auch in dem durch Gegenstromverteilung gewonnenen reinsten Erdnuß-phytoglykolipid konnte ein in gewissen Grenzen konstant bleiben-der Prozentsatz an unveraschbarer Substanz festgestellt werden. Da sich selbst durch eine gründliche Dialyse des Erdnußphytoglykolipids gegen Wasser der Aschegehalt nicht wesentlich veränderte (Phytoglykolipid IV: 6.35% vor und 6.75% nach der Dialyse) dürfte das Erdnußphytoglykolipid wie alle sauren Inositide ganz oder teilweise in Form von Ca- oder Mg-salzen vorliegen. Die Salzbildung dürfte an die Inositphosphatstruktur des Phytoglykolipidmoleküls gebunden sein. Ein Beweis für ihre anionische Struktur ist die Eigenschaft der Phytoglykolipide mit dem elektrischen Strom zur Anode zu wandern⁶⁸⁾. Für die Angabe der prozentualen Stickstoff- und Phosphorwerte der Erdnußphytoglykolipide legen wir der Berechnung die Formeln:

Hexosidform: $C_{66}H_{124}N_2PO_{28}(Ca-)(1464.6)$ (Hexosid: Galaktosid bzw. Mannosid)

Pentosidform: $C_{65}H_{122}N_2PO_{27}(Ca-)(1434.6)$ (Pentosid: Arabinosid) zugrunde.

Das genaue Molekulargewicht der Erdnußphytoglykolipide ließ sich nicht ermitteln. Somit bleibt auch weiterhin ungeklärt, ob die Erdnußphytoglykolipid in einer monomeren oder polymeren Form vorliegen. Für ein Polymerisat spricht die Alkalistabilität, die Säureempfindlichkeit und die Schwerlöslichkeit in Pyridin.

Die beim Säureaufschluß entstehenden Spaltstücke sind besser pyridinlöslich als das Polymerisat. Die monomeren Phytoglykolipidmoleküle scheinen in ihrer Struktur durch Säureeinfluß nicht verändert zu werden.

Im S a c c h a r i d a n t e i l des Moleküls fanden wir papierchromatographisch M a n n o s e , G a l a k t o s e , A r a b i n o s e , I n o s i t , G l u k o s a m i n und G l u k u r o n s ä u r e . Die quantitative Bestimmung der Gesamtheit der Hexosen und Pentosen erfolgte nach einer Methode von MALLOV⁷⁷⁾, die des Inosits nach der Methode von BÖHM und RICHARZ⁷⁸⁾ und die des Glukosamins nach der Methode von ELSON und MORGAN⁷⁹⁾ in der Modifikation von BLIX⁸⁰⁾. Die Methode von DISCHE⁸¹⁾ ermöglicht die quantitative Bestimmung und nähere Charakterisierung der Uronsäure. Die Uronsäure des Erdnußphytoglykolipids konnte als G l u k u r o n s ä u r e identifiziert werden, da von allen Uronsäuren nur bei der Glukuronsäure die bei 480 m μ gemessenen Extinktionswerte größer sind als die bei 410 m μ .

In der nachfolgend aufgeführten Tabelle sind die ermittelten prozentualen Werte der Gesamtzucker (Arabinose, Mannose und Galaktose), des Inosits, des Glukosamins und der Glukuronsäure angegeben.

T a b e l l e 12

Der Hexosen-, Pentosen-, Inosit-, Glukosamin- und Glukuronsäuregehalt der Erdnußphytoglykolipide

Phytoglykolipid	% Gesamtzucker (Hexosen + Pentosen) ber. als Galaktose	% Inosit	% Glukosamin	% Glukuronsäure
II 2mal aus Pyridin umgefällt	8.42	10.55	9.90	18.00
IV	10.64	10.00	8.90	14.42
V	11.65	9.65	7.94	14.27

Zur Darstellung eines phosphorfreien Oligosaccharids unterwarfen wir das Erdnußphytoglykolipid einer partiellen Hydrolyse mit gesättigter wässriger Bariumhydroxydlösung. Wir isolierten aus dem Hydrolysat durch Ionenaustauschchromatographie eine Verbindung, die ein aus Inosit, Glukosamin, Glukuronsäure und 1 Mol Hexose oder Pentose bestehendes Tetrasaccharid darstellte. An Hexosen und Pentosen ließen sich Mannose, Galaktose und Arabinose nachweisen. Die Substanz war ohne Rückstand in Wasser gut löslich und besaß einen definierten Schmelzpunkt von 232 - 235°C. Auf Grund der ermittelten CH-Werte kommt dem phosphorfreien Oligosaccharid folgende Bruttoformel zu:



Die Summenformel entspricht einem unveresterten, aus je 1 Mol Inosit, Glukosamin, Glukuronsäure und Pentose bestehendem Oligosaccharid. Das isolierte phosphorfreie Oligosaccharid ist chromatographisch einheitlich. Das Inosit, das Glukosamin, die Glukuronsäure und die Gesamtzucker (Mannose, Galaktose und Arabinose) wurden mit Hilfe der oben bereits erwähnten Methoden quantitativ bestimmt (Tab. 13).

T a b e l l e 13

Quantitative Bestimmung der einzelnen Bausteine eines phosphorfreien Oligosaccharids

Zuckerbausteine	ber. für Tetrasaccharid aus Inosit, Glukosamin, Glukuronsäure u. Arabinose %	ber. für Tetrasaccharid aus Inosit, Glukosamin, Glukuronsäure u. Mannose od. Galaktose %	gef. für isoliertes Oligosaccharid %
Gesamtanteil an Hexosen und Pentosen	21.58	24.75	24.04
Inosit	25.85	24.75	23.91
Glukosamin	25.50	24.50	26.29
Glukuronsäure	27.65	26.50	28.00

Wie aus der Tabelle hervorgeht, liegen die ermittelten quantitativen Werte zwischen denen eines Tetrasaccharids bestehend aus Inosit, Glukosamin, Glukuronsäure und Arabinose und denen eines Tetrasaccharids der Zusammensetzung Inosit, Glukosamin, Glukuronsäure und Mannose bzw. Galaktose.

Zur Bestimmung der prozentualen Verteilung der Arabinose, Mannose und Galaktose im phosphorfreien Oligosaccharid trennten wir die Monosaccharide nach der Hydrolyse des Oligosaccharids papierchromatographisch auf, eluierten die einzelnen Zuckerflecken aus dem Chromatogramm und oxydierten die eluierte Substanz nach einer Vorschrift von WEYGAND⁸²⁾ mit Perjodsäure. Arabinose, Mannose und Galaktose fanden wir in einem Verhältnis von 20:4.2:10 vor. 14.05% des phosphorfreien Oligosaccharids bestanden demnach aus Arabinose, 7.02% aus Galaktose und 2.95% aus Mannose. Das aus dem Erdnußphytoglykolipid erhaltene phosphorfreie Oligosaccharid dürfte den gesamten Saccharidanteil des Erdnußphytoglykolipids representieren. Obgleich das isolierte phosphorfreie Oligosaccharid chromatographisch einheitlich war, muß aus den Prozentwerten auf die Anwesenheit mehrerer strukturgleicher Oligosaccharide geschlossen werden. Die Oligosaccharide dürften über variable Hexosen- und Pentosenanteile verfügen.

Behandelt man das phosphorfreie Oligosaccharid 30 Minuten lang bei 100°C mit 2n wässriger Schwefelsäure, so wird aus dem Oligosaccharid noch ein Mol Zucker abgespalten und man erhält ein Trisaccharid, das sich aus Inosit, Glukosamin und Glukuronsäure zusammensetzt. Die einzelnen Komponenten des durch seine CH-Werte charakterisierten Trisaccharids wurden ebenfalls quantitativ bestimmt (Tab.14).

T a b e l l e 1 4

Quantitative Bestimmung der einzelnen Bausteine des Trisaccharids

Trisaccharid	% Inosit	% Glukosamin	% Glukuronsäure
berechnet für $C_{18}H_{31}O_{16}N$ (517,544)	32.4	32.2	35.05
gefunden	31.35	31.42	34.52

Das isolierte Trisaccharid spricht für eine direkte Verbindung der drei Monosaccharide Inosit, Glukosamin und Glukuronsäure im Glykolipidmolekül.

Das phosphorhaltige Oligosaccharid konnte wegen seiner Säureempfindlichkeit nur in schlechter Ausbeute erhalten werden. Es wies die gleiche qualitative Zuckerzusammensetzung wie das phosphorfreie Oligosaccharid auf. Die Verbindung setzte sich aus Phosphat, Arabinose, Mannose, Galaktose, Inosit, Glukosamin und Glukuronsäure zusammen.

Ohne Schwierigkeiten gelang dagegen die Isolierung eines Inositolmonophosphats und eines Ceramidphosphats.

Das Inositolphosphat, das nach 1-stündiger Hydrolyse des Erdnußphytoglykolipids bei 100°C mit 6n wässriger Salzsäure papierchromatographisch nachzuweisen war, konnte aus dem gleichen Hydrolysenansatz durch Fällung mit Bleitetraacetat isoliert und nach Reinigung durch Ausfällen aus seiner wässrigen Lösung mit absolutem Alkohol über seinen Schmelzpunkt (Smp.: 199.5 - 203°C) identifiziert werden.

Das isolierte Ceramidphosphat wurde durch seinen Schmelzpunkt (140 - 143°C), durch seinen Gehalt an Stickstoff (%N = 1.89) und Phosphor (%P = 4.15) charakterisiert. ODA⁶⁶) bestimmte für ein aus Hefe isoliertes Cerebrinphosphat einen Schmelzpunkt von 143 - 144°C.

Damit war zugleich bewiesen, daß das Phosphat den Ceramid- und Saccharidanteil des Erdnußphytoglykolipids verknüpft.

Als Nebenprodukt fiel bei der Isolierung des Ceramidphosphats ein Ceramid an. Seine Löslichkeitseigenschaften, sein Stickstoffgehalt (%N = 2.12) und sein dünnenschichtchromatographisches Verhalten waren ähnlich denen der bekannten Ceramide (Cerebrine) der Hefen.

Die qualitative Zusammensetzung der Sphingosine und Fettsäuren des Ceramids und des Ceramidphosphats war die gleiche wie sie nach Totalhydrolyse des Erdnußphytoglykolipids ermittelt wurde. Das Ceramid enthielt die gesamten Fettsäuren und Sphingosinbasen

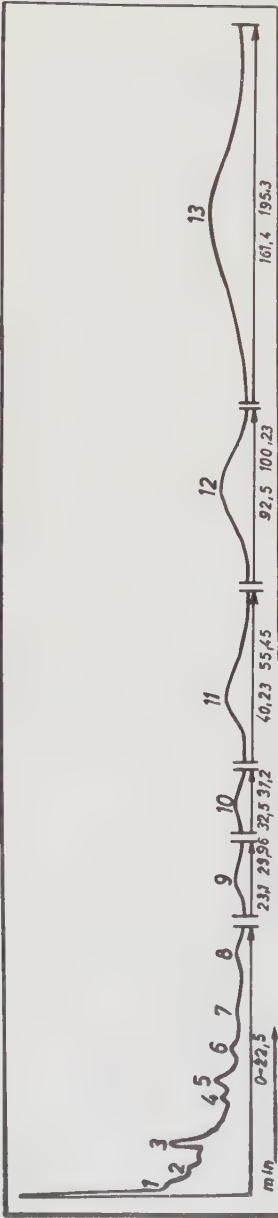


Abb. 22

Gaschromatographie der Fettsäuren des Erdnußphytylglykolipids an einer Polyesterssäule

- 1 = Laurinsäure
- 2 = Myristinsäure
- 3 = Palmitinsäure
- 4 = Stearinsäure
- 5 = Ölsäure
- 6 = Linolsäure

- 7 = Arachinsäure
- 8 = Linolensäure
- 9 = Behensäure
- 10 = Arachidonsäure
- 11 = Lignocerinsäure
- 12 = α -Hydroxybehensäure
- 13 = Cerebronsäure

des Erdnußphytoglykolipidmoleküls. Die Fettsäuren sind wie in allen Sphingolipiden an die NH_2 -Gruppe der Sphingosine gebunden.

Glyzerin ließ sich im Erdnußphytoglykolipid nicht nachweisen.

Die Fettsäuren des Erdnußphytoglykolipidkomplexes setzten sich, wie die gaschromatographischen Untersuchungen ergaben (Abb. 22, S. 54) im wesentlichen aus langkettigen Hydroxyfettsäuren wie Hydroxybehensäure (25.10%), Cerebronsäure (43.8%) und Hydroxyce-
rotinsäure (4.2%) zusammen.

T a b e l l e 15

Gaschromatographie der Fettsäuren des Erdnußphytoglykolipids

Fettsäuren	% des Fettsäuregemisches
Laurinsäure	0.79
Myristinsäure	0.31
Palmitinsäure	2.37
Stearinsäure	0.79
Ölsäure	2.37
Linolsäure	1.26
Linolensäure	0.79
Arachinsäure	0.95
Behensäure	3.00
Arachidonsäure	1.89
Lignocerinensäure	12.30
Hydroxybehensäure	25.10
Cerebronsäure	43.80
Hydroxycerotinsäure	4.20

Damit stimmt das Fettsäuremuster des Erdnußphytoglykolipids in seinen Hauptbestandteilen mit dem ähnlicher Sphingolipide bzw. Phytoglykolipide überein.

Bemerkenswert war das vollkommene Fehlen ungesättigter langkettiger- oder Hydroxyfettsäuren und eine geringe Konzentration der sonst nur in den Phosphatiden stark vertretenen Öl-, Linol- und Linolensäuren.

Nach den in der Tabelle 16 zusammengefaßten Ergebnissen der quantitativen Analyse besteht der Erdnußphytoglykolipidkomplex aus 20-22% Phytosphingosinen, 10-12% Hexosen und Pentosen, 10-11% Inosit, 8-10% Glukosamin, 14% Glukuronsäure, 2% Phosphor, 2% Stickstoff und 5-7% anorganischen Anteil. Den Rest des Moleküls (26-27%) bilden langkettige Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren.

T a b e l l e 16

Die Zusammensetzung der Erdnußphytoglykolipide II, IV und V

Phyto- glykolipide	% N	% P	Asche %	Zucker %	Inosit %	Gluko- samin%	Glukuron- säure %
II	1.99	1.98	5.43	8.42	10.55	9.90	18.00
IV	2.17	1.98	6.35- 6.75	10.64	10.00	8.90	14.42
V	2.10	2.12	5.05	11.65	9.65	7.94	14.27

Tabelle 16 zeigt, daß die Erdnußphytoglykolipidkomplexe IV und V eine weitgehend gleiche prozentuale Zusammensetzung haben. Dagegen weicht der Erdnußphytoglykolipidkomplex II mit einem Gesamtzuckergehalt von 8.05 - 8.80%, einem Inositgehalt von 9.52 - 11.64% und einem Glukuronsäuregehalt von 17.8 - 18.20% stärker ab.

Alle gefundenen Prozentwerte stimmen jedoch in etwa mit der nach der errechneten Bruttoformel erwarteten Zusammensetzung des Erdnußphytoglykolipids aus aequimolaren Mengen C_{18} -Phytosphingosin, C_{24} - oder C_{26} -Hydroxyfettsäuren, Phosphat, Inosit, Glukosamin, Hexose oder Pentose und Glukuronsäure überein. Für das Molekulargewicht des Erdnußphytoglykolipids muß deshalb ein Wert von mindestens 1500 angenommen werden.

Die etwas voneinander abweichende Zusammensetzung der einzelnen Phytoglykolipidpräparate läßt sich mit der Anwendung von sauren und alkalischen Agentien bei der Gewinnung der Phytoglykolipide erklären. Säuren und Alkali zeigten dabei je nach ihrer Stärke und Einwirkungsdauer einen verschieden starken Effekt.

T a b e l l e 17

Vergleich der Zusammensetzung verschiedener Phytoglykolipide mit dem Erdnußphytoglykolipid

Phytoglykolipid aus:	N %	P %	Asche %	Sphing.N %	opt.Drehg. o	Zucker %	Inosit %	Gluko- samin %	Glukuron- säure %
Erdnuß, diese Arbeit	2.17	1.98	6.35- 6.75	0.83- 0.85	+ 51.2	10.64	10.00	8.90	14.42
Mais ⁶⁸⁾	1.88	1.93		0.73	+ 50.0				
Flachs ⁶⁸⁾	1.50- 1.68	1.75- 1.84		0.61- 0.83	+ 47.3	15.0			
Soja ⁶⁸⁾	1.66	2.07		0.79	+ 53.0	20.0			
Soja ⁸⁴⁾	1.66- 1.95	2.15- 2.85	10.72- 14.3	0.24- 0.79		18.0- 26.2	11.62- 12.80	3.52- 7.04	
Baumwollsaat ⁶⁸⁾	1.66	2.01		0.80	+ 47.0	15.0			
Sonnenblumenkern ⁶⁸⁾	1.60	1.66		0.60	+ 51.0	20.0			

So waren die aus säurebehandelten Phosphatiden gewonnenen Erdnußphytoglykolipide IV besser pyridinlöslich als die auf gleiche Weise aus unbehandelten Phosphatiden gewonnenen Erdnußphytoglykolipide I.

Daß bei sinkendem Pentosen- und Hexosengehalt (Tab. 16, S. 56; Erdnußphytoglykolipide II, IV, V) der Gehalt an Inosit und insbesondere an Glukosamin und Glukuronsäure zunahm (Tab. 16; Erdnußphytoglykolipide II, IV, V), läßt sich damit erklären, daß unter dem Einfluß des Alkali ein Teil der Hexosen und Pentosen vom Phytoglykolipidmolekül abgespalten wurde.

Durch Säureeinfluß wurden vor allem die Löslichkeitseigenschaften, der Asche- und Stickstoffgehalt der Erdnußphytoglykolipide verändert (Tab. 11, S. 49; Erdnußphytoglykolipide I, IV, V).

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß die C r a i g - v e r t e i l u n g von Phosphatiden und Inositiden die b e s t e u n d s c h o n e n d s t e M e t h o d e darstellt, um Verbindungen vom Typ des Phytoglykolipids in weitgehend genuinem Zustand zu erhalten.

Wie aus der Tabelle 17, S. 57, hervorgeht, bestehen zwischen dem Erdnußphytoglykolipid und den anderen bekannten Phytoglykolipiden in der Zahl und prozentualen Verteilung der Hexosen und Pentosen differenzierte Unterschiede. Das E r d n u ß p h y t o - g l y k o l i p i d enthält neben Inosit, Glukosamin, Glukuronsäure, Arabinose, Mannose und Galaktose. Der Zuckeranteil ist ein Tetrasaccharid. Die Hexosen und Pentosen machen etwa 10-12% des gesamten Phytoglykolipidmoleküls aus. Das Verhältnis Arabinose-Mannose-Galaktose beträgt etwa 20:4.2:10. Im M a i s - p h y t o g l y k o l i p i d sind die Verhältnisse ähnlich wie im Erdnußphytoglykolipid⁸³⁾. Nach CARTER⁸³⁾ liegen im Maisphytoglykolipid die Hexosen und Pentosen zusammen mit dem Glukosamin, der Glukuronsäure und dem Inosit in aequimolaren Mengen vor (Hexasaccharid). Das S o j a p h y t o g l y k o l i p i d besitzt ebenfalls Mannose, Arabinose und Galaktose⁸⁴⁾. Die F l a c h s p h y t o g l y k o l i p i d e bestehen nach CARTER⁸³⁾ aus einer hexuronsäure- und hexosaminfreien Phytogly-

kolipidkomponente und einer hexuronsäure- und hexosaminhaltigen zweiten Komponente. Beide Phytoglykolipide enthalten Mannose, Galaktose und Arabinose und zusätzlich noch Fucose. Sie unterscheiden sich allerdings grundlegend in der Struktur bzw. der Molekülgröße ihres Saccharidanteils. Dieser Befund gibt bereits einen Hinweis, daß einzelne in ihrer Struktur deutlich voneinander verschiedene Phytoglykolipide existieren.

Ein Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der Sphingosine und des qualitativen Fettsäuremusters des Erdnußphytoglykolipidmoleküls mit der der Soja-, Mais- und Flachsphytoglykolipide zeigte gewisse herkunftsbedingte Unterschiede.

Die verschiedenen Phytoglykolipide unterscheiden sich sehr deutlich voneinander in der prozentualen Verteilung des C_{18} -Phytosphingosins und des C_{18} -Dehydro^{phyto}sphingosins (Tab. 7, S. 32).

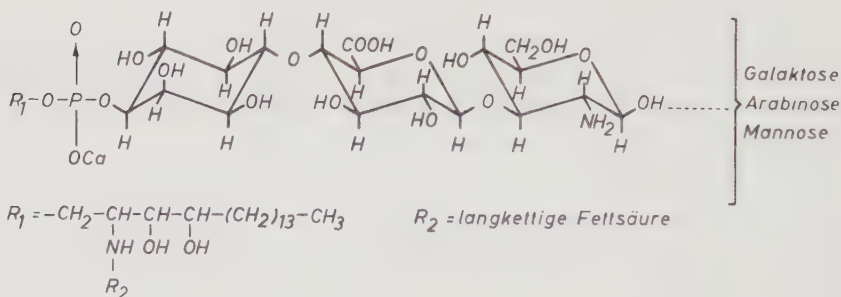
Sojaphytoglykolipid und Maisphytoglykolipid besitzen nach den Angaben von CARTER⁶⁸⁾ ebenso wie das Erdnußphytoglykolipid die typischen Sphingolipidfettsäuren Cerebronsäure, Hydroxycerotinsäure und Lignocerinsäure. Zusätzlich kommen noch Palmitinsäure und Stearinsäure vor. In der nachfolgenden Tabelle 18 sind die Angaben über die qualitative und quantitative Verteilung der Fettsäuren im Soja- und Maisphytoglykolipid⁶⁸⁾ zusammengefaßt.

T a b e l l e 18

Die Verteilung der Fettsäuren in den verschiedenen Phytoglykolipiden

Fettsäuren	Sojaphytoglykolipid ⁶⁸⁾	Maisphytoglykolipid ⁶⁸⁾	Erdnußphytoglykolipid (Auszug aus Tab. 16, S. 56)
	%	%	%
Palmitinsäure	95	24	2.37
Stearinsäure			0.79
Ölsäure	-	-	2.37
Lignocerinsäure	-	11	12.30
Hydroxybehensäure	-	-	25.10
Cerebronsäure	5	65	43.80
Hydroxycerotinsäure	-		4.20

Trotz der noch fraglichen Molekülgröße des Phytoglykolipidkomplexes ist somit für das Erdnußphytoglykolipid die gleiche Struktur zu fordern wie sie kürzlich von CARTER⁸⁵⁾ für die Phytoglykolipide allgemein postuliert wurde.



Strukturvorschlag für den Erdnußphytoglykolipidkomplex

Da das Erdnußphytglykolipid wie die Phytglykolipide aus anderen Herkünften ein Komplex aus mindestens fünf Komponenten darstellt, ist anzunehmen, daß hierfür Unterschiede im Saccharidanteil verantwortlich zu machen sind.

C. Die Untersuchung der Sphingolipide der Hefen *Candida utilis* und *Saccharomyces cerevisiae*

Nachweis, Isolierung und Strukturaufklärung der Hefesphingolipide

I. Chromatographie der Sphingolipide

Chromatographisch war in den Phosphatidextrakten aus Bäckerhefe und Candidahefe neben einem Cerebrin und einem Cerebrosid eine Substanz nachweisbar, die in ihrem R_f -Wert und ihrem Verhalten gegenüber Anfärbereagentien dem Erdnußphytoglykolipid entsprach (Abb. 23).

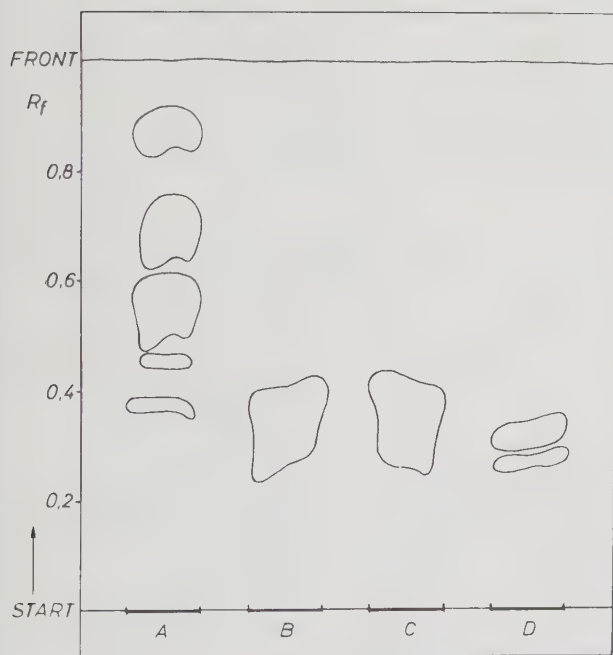


Abb. 23

Papierchromatographie der *Candida*- und *Saccharomyces*mycoglykolipide

Aufsteigende Chromatographie auf Formaldehyd-imprägniertem Papier

Fließmittel: n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

Anfärbereagens: Rhodamin-B-Lösung

- A = Phosphatidgemisch aus *Saccharomyces*hefe
- B = *Saccharomyces*mycoglykolipid
- C = *Candida*mycoglykolipid
- D = Erdnußphytoglykolipid

In der nach alkalischer Verseifung der Fette und Esterphosphatide gewonnenen Sphingolipidfraktion der Candida- und Saccharomyceshefen waren papierchromatographisch drei mit Rhodamin-B-Lösung und Nilblaulösung anfärbbare Substanzen im R_f -Bereich 0.30 - 0.96 nachweisbar. Die Verbindung bei 0.30 - 0.40 im Papierchromatogramm der Candidasphingolipidfraktion entsprach den Komponenten des Erdnußphytoglykolipids, die Substanz bei 0.80 - 0.86 dem Cerebrin und die Verbindung mit dem R_f -Wert 0.94 - 0.96 einem unveresterten Rinderhirncerebrosid (Abb. 24). In der Saccharomycessphingolipidfraktion schien die Verbindung mit dem R_f -Wert von 0.94 - 0.96 zu fehlen.

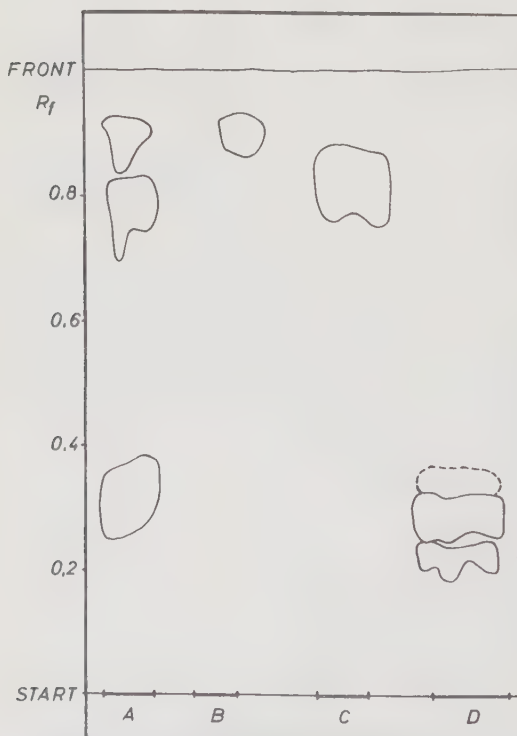


Abb. 24

Papierchromatographische Trennung der Hefesphingolipide

Aufsteigende Chromatographie auf Formaldehyd-impregniertem Papier

Fließmittel: n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

Anfärbereagens: Rhodamin-B-Lösung

A = Sphingolipidfraktion aus Candidahefe

B = Hefecerebrin

C = unverestertes Rinderhirncerebrosid

D = Erdnußphytoglykolipid

Während die phytoglykolipidähnliche Substanz papierchromatographisch direkt im Rohsphingolipidauszug nachweisbar war, gelang ein exakter chromatographischer Nachweis der Cerebrine und Cerebroside erst nach Zerstörung der sie begleitenden Esterphosphatide. Für die sichere Analyse der niedermolekularen Hefesphingolipide, der Cerebrine und Cerebroside, stellte die Dünnschichtchromatographie die Methode der Wahl dar.

Wie wir anhand von Modellversuchen zeigen konnten (Abb. 25), gelingt durch Chromatographie auf Kieselgel-G-Platten im Fließmittel CHCl_3 -MeOH(9:1) die für eine Analyse der Hefesphingolipide wichtige Trennung der Cerebrine, ihrer Anhydroformen, der Cerebroside und der Sterolglykoside. Die Verbindungen identifizierten wir mit Hilfe der im experimentellen Teil beschriebenen differenzierenden Anfärbemethoden. Das Bialsche Reagens nach KLENK und LANGERBEINS⁸⁶⁾ ermöglichte die Unterscheidung der Cerebroside und Sterolglykoside von den Cerebrinen, Anhydrocerebrinen und Sterinen und das Liebermann-Burchardreagens die der Sterolglykoside von den Cerebroside.

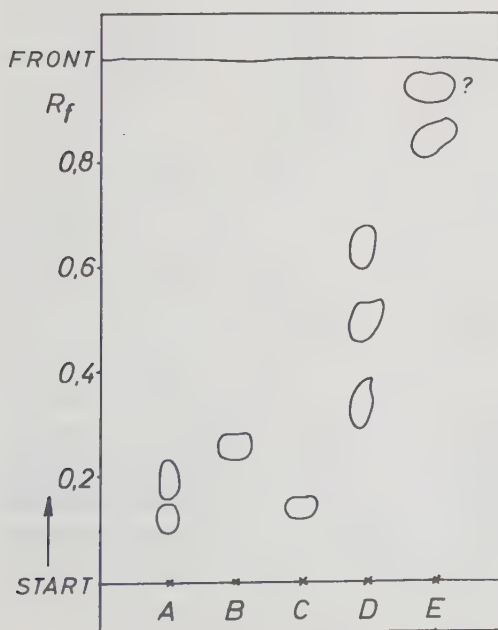


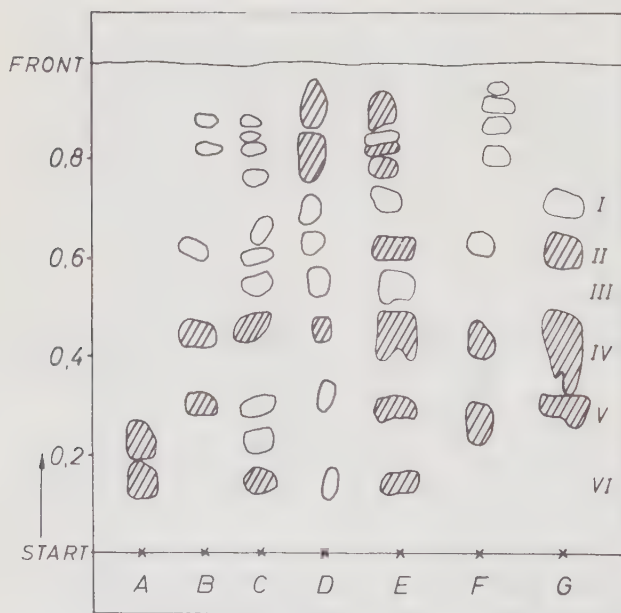
Abb. 25

Dünnschichtchromatographie der Sphingolipide der Hefen
Kieselgel-G
Fließmittel: CHCl_3 -MeOH₃(9:1)

- A = Rinderhirncerebroside
- B = Sterolglykosid aus Sojabohnen
- C = Candidacerebrosid
- D = Carebrine aus Candida utilis-Hefe
- E = Anhydrocerebrin

In der Candidasphingolipidfraktion (Abb. 26) waren neben Sterinen (R_F -Wert: 0.8-1.0) einzelne Cerebrine (I,II,III,IV,V) und eine cerebrosidähnliche Substanz (VI) nachzuweisen. In der Saccharomycesfraktion (Abb. 26) fanden wir neben den Sterinen ebenfalls mehrere Cerebrine (II,IV,V). Wie die Abb. 26 zeigt, wies die Candidasphingolipidfraktion eine größere Anzahl an Cerebrinen auf als die Saccharomycessphingolipidfraktion. Ein "Cerebrosid" war in der Saccharomycesfraktion nur in sehr geringer Konzentration vorhanden.

Abb. 26



Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Sphingolipide der Hefen

Kieselgel-G

Fließmittel:
 CHCl_3 -MeOH (9:1)

- A = Rinderhirn-cerebroside
- B = Sphingolipidfraktion der Saccharomyces-
hefe
- C = Sphingolipidfraktion der Candidahefe
- D = Ätherextrakt der Candida-sphingolipidfraktion
- E = Alkoholextrakt der Candida-sphingolipidfraktion
- F = Alkoholextrakt der Saccharomycessphingolipidfraktion
- G = Candidacerebrine, gereinigt

2. Isolierung der Candida- und Saccharomyces-sphingolipide

Zur Extraktion der Hefelipide entwickelten wir ein den bisherigen Methoden überlegenes Extraktionsverfahren.

Den größten Teil der Lipide und Phosphatide der Hefen konnten wir bei 37° bzw. 50°C mit Chloroform-Methanolgemischen (Zusammensetzung siehe Versuchsteil S.152) extrahieren. Nach einer kurzen Behandlung der Hefen mit kochendem Methanol zur Spaltung der Lipidsymplexe entzogen wir den Hefen durch Heißeextraktion mit Chloroform-Methanol-Wassermischungen (Zusammensetzung siehe Versuchsteil S.152) den restlichen Teil der Lipide. Nach Zerstörung der Esterphosphatide und Glyzeride durch alkalische Hydrolyse erhielten wir einen unverseifbaren Rückstand (Sphingolipidfraktion), der bei der Candidahefe 0.235%, bei der Saccharomyceshefe 0.37% der Trockensubstanz betrug und sich, wie die papier- und dünn-schicht-chromatographischen Untersuchungen ergaben, aus den obengenannten Cerebrinen, aus Cerebrosid, Phytoglykolipid und Sterinen zusammensetzte.

Die Fraktionierung der Sphingolipidfraktion erfolgte nach dem in Tabelle 19, S. 66, angegebenen Schema. Hierdurch gelang eine Zerlegung in Fraktionen, die aus Sterinen, Cerebrinen, Cerebrosiden und einer phytoglykolipidähnlichen Substanz bestanden.

Allerdings konnte hiermit nur das phytoglykolipidähnliche Mykoglykolipid der Candida- und Saccharomyceshefe von den Sterinen, Cerebrinen und Cerebrosiden getrennt und rein dargestellt werden. Cerebrine und Cerebroside ließen sich auf Grund ihrer fast identischen Löslichkeitseigenschaften auf diese Weise nicht voneinander trennen.

Eine quantitative Auftrennung des Hefesphingolipidgemisches war erst durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule möglich. Die Chromatographie des sterinfreien Sphingolipidgemisches erfolgte an einer Kieselgelsäule unter Verwendung von reinem Chloroform, dem steigende Mengen Methanol zugesetzt wurden. Das nachfolgend aufgeführte Chromatogrammschema zeigt den Verlauf der säulenchromatographischen Auftrennung der Hefesphingolipide (Abb. 27, S. 67).

T a b e l l e 19

Die Fraktionierung von Sphingolipidgemischen aus Candida- und Saccharomyceshefen mit Hilfe von Lösungsmitteln

Sphingolipidgemisch

(Sterine, Cerebrine, Cerebroside, Mykoglykolipide)

Ätherextraktion

Lösung

Sterine

(Cerebrine)

(Mykoglykolipide)

Unlösliches

Cerebrine

Cerebroside

Mykoglykolipide

Äther-

extraktion

Lösung

Sterine

Unlösliches

Cerebrine

Mykoglyko-

lipide

Äthanolextraktion

od. Methanolextraktion

Lösung

Cerebrine

Cerebroside

(Mykoglyko-

lipide)

Unlösliches

Mykoglykolipide

Chloroformextraktion

Lösung

Cerebrine

Cerebroside

(Mykoglyko-

lipide)

Unlösliches

Mykoglykolipide

Äthanolextraktion

od. Methanolextraktion

Lösung

Cerebrine

Cerebroside

Unlösliches

Mykoglykolipide



Abb. 27

Säulenchromatographische Fraktionierung eines Sphingolipidgemisches aus Candidahefe

A = Alkoholextrakt der Candidasphingolipidfraktion

B = Fraktionierung des Extraktes an einer Kieselgelsäule

Wie aus dem Chromatogrammschema hervorgeht, konnten mit dieser Methode Cerebrine, Cerebrosid und Mykoglykolipid der Candidahefe als Reinsubstanzen erhalten werden. Zur Verbesserung der Ausbeuten wurden die Mischfraktionen nochmals in gleicher Weise chromatographiert. Aus 1.46 g Alkoholfraction (Cerebrine, Cerebrosid und Mykoglykolipid) ließen sich 0.063 g reines Cerebrosid (= 4.38% der Alkoholfraction) und 0.93 g reine Cerebrine (= 63.7% der Alkoholfraction), aus 1.07 g Alkoholfraction außerdem 0.081 g reines Mykoglykolipid (= 7.67% der Alkoholfraction) isolieren.

Da die Fraktionierung praktisch quantitativ verlief, ergibt sich für die Sphingolipidfraktion der Candidahefe folgende Zusammensetzung:

Sterine und Kohlenwasserstoffe	22%
Alkoholfraktion (Cerebrine und Cerebrosid)	54%
Mykoglykolipidfraktion	33%

3. Strukturaufklärung der Mykoglykolipide, Cerebrine und Cerebroside der Hefen

a) Die Mykoglykolipide von Candida utilis- und Saccharomyces cerevisiae-Hefen

Die erhaltenen Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide sind alkalistabil, enthalten organisch gebundenen Phosphor und zersetzten sich beim Erhitzen auf 240° ohne zu schmelzen. Sie sind in Pyridin gut löslich, in anderen organischen Lösungsmitteln, wie Alkoholen oder Chlorkohlenwasserstoffen schlecht löslich. Die Hefemykoglykolipide ließen sich mit wässriger Kali- oder Natronlauge kolloidal in Lösung bringen. Phosphor- und Stickstoffgehalt des Candidamykoglykolipids und des Saccharomycesmykoglykolipids sind annähernd gleich (Tab. 20, S. 69).

Die CH-Werte der Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide zeigen keine großen Abweichungen. Nach Bestimmung der CH-, Stickstoff- und Phosphorwerte konnten wir sowohl für das Candidamykoglykolipid wie für das Saccharomycesmykoglykolipid folgende gemeinsame Bruttoformel aufstellen:



Bei einem mittleren Molekulargewicht des Mykoglykolipids von 1200 beträgt nach den quantitativen papierchromatographischen Untersuchungen der Mykoglykolipidgehalt bei der Candidahefe 0.0923% der Trockenhefe, bei der Saccharomyceshefe 0.1146% der Trockensubstanz.

Nach saurer Hydrolyse der Mykoglykolipide konnten wir im Hydrolysat des Candidamykoglykolipids und des Saccharomycesmy-

koglykolipids papierchromatographisch M a n n o s e und I n o s i t nachweisen. Die quantitative Bestimmung der Spaltprodukte ergab folgendes Ergebnis (Tab. 20).

T a b e l l e 20

Die Zusammensetzung der Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide

Mykoglyko- lipid	N %	P %	Asche %	Hexose %	Inosit %	Sphingosin %
Candida utilis	1.89	2.83	7.42	16.41	17.57	32.11
Saccharo- myces cere- visiae	1.96	2.60	7.58	16.27	18.20	31.75

Die partielle Säurehydrolyse von Candida- und Saccharomycesmykoglykolipiden lieferte I n o s i t m o n o p h o s p h a t , identifiziert durch seinen R_F -Wert und seine Anfärbbarkeit mit Hanes-Isherwoodreagens.

Die Gaschromatographie der nach saurer Hydrolyse der Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide erhaltenen Fettsäuren ergab nachstehende Zusammensetzung:

T a b e l l e 21

Ergebnis der gaschromatographischen Analyse der Hefemykoglykolipid-fettsäuren

Fettsäuren	Candidamykoglykolipid	Saccharomycesmykoglykolipid
	% des Fettsäurege- misches	% des Fettsäuregemisches
Arachinsäure	nicht exakt meßbar	nicht exakt meßbar
Behensäure	6.99	11.4
Lignocerinsäure	8.45	3.94
Cerotinsäure	nicht exakt meßbar	34.1
α -Hydroxybehen- säure	1.27	14.45
α -Hydroxylignocerin- säure	56.40	36.20
C ₃₀ -Fettsäure	3.91	-
α -Hydroxycerotinsäure	23.19	-

Danach besteht das **F e t t s ä u r e g e m i s c h** des Candidamykoglykolipids zur Hauptsache aus Hydroxylignocerinsäure (56.4%) und Hydroxycerotinsäure (23.19%), das des Saccharomycesmykoglykolipids aus Behensäure (11.4%), Cerotinsäure (34.1%), Hydroxybehensäure (14.45%) und Hydroxylignocerinsäure (36.20%) (Abb. 28, S.71 und Abb. 29, S.72).

Wie die Tabelle 20, S.69, zeigt, besitzen die Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide annähernd gleiche Stickstoff-, Phosphor- und Aschewerte. Im Hexosen-, Inosit- und Sphingosingehalt beider Mykoglykolipide ließen sich nur geringfügige Differenzen feststellen (Tab.20,S.69).

Das durchschnittliche Molekulargewicht der Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide dürfte etwa 1150 - 1200 betragen. Vergleicht man die Zusammensetzung und die Eigenschaften der phosphor- und zuckerhaltigen Sphingolipide der Hefen und der höheren Pflanzen, der Mykoglykolipide und Phytoglykolipide, so lassen beide Sphingolipide gewisse Gemeinsamkeiten erkennen.

Die Mykoglykolipide sind ebenso wie die Phytoglykolipide bevorzugt in Pyridin löslich. Beide Verbindungen lassen sich nur papierchromatographisch exakt nachweisen und besitzen dabei annähernd die gleichen R_F -Werte. Die Mykoglykolipide sind im Gegensatz zu den Phytoglykolipiden chromatographisch einheitliche Substanzen. Die Hefemykoglykolipide besitzen ähnlich wie die Phytoglykolipide einen konstanten Aschegehalt, der sich durch Dialyse nicht verringern läßt. Die Mykoglykolipide dürften wie die Phytoglykolipide in Salzform vorliegen. Mykoglykolipide wie Phytoglykolipide enthalten organisch gebundenen Phosphor.

Die für die Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide errechneten Bruttoformeln entsprechen einem aus je 1 Mol C_{20} -Phytosphingosin, Cerebronsäure, Phosphat, Inosit und Hexose bestehendem Sphingolipid, das vermutlich als Ca- oder Mg-salz vorliegt. Die ermittelten quantitativen Werte der Sphingosine, des Inosits, der Hexose und des Phosphats stimmten mit der mutmaßlichen Zusammensetzung des Mykoglykolipids aus aequimolaren Mengen Sphingosinen, Fettsäuren, Phosphat, Inosit und Hexose überein.

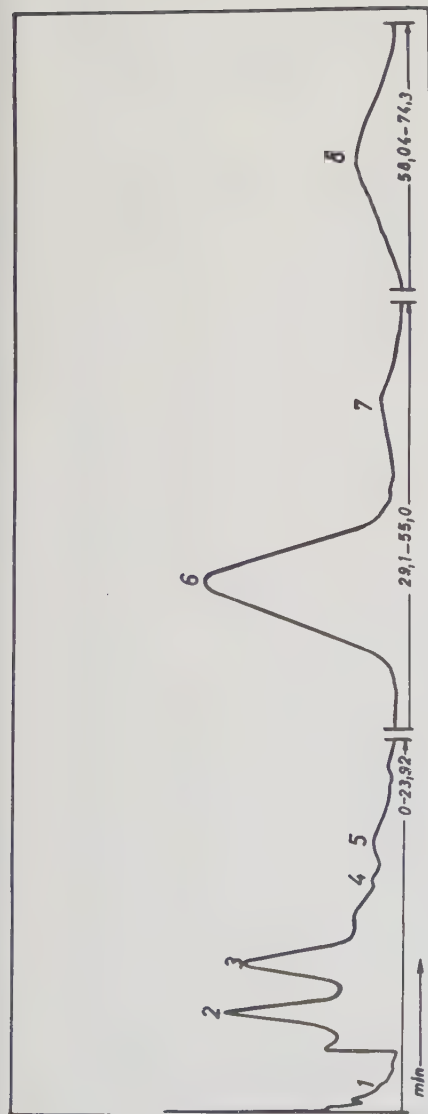


Abb. 28

Gaschromatographie der Fettsäuren des Candidamykolykolipids an einer Polyestersäule

- 1 = Arachinsäure
- 2 = Behensäure
- 3 = Lignocerinäure
- 4 = Cerotinsäure

- 5 = α -Hydroxybehensäure
- 6 = α -Hydroxylignocerinäure
- 7 = C₂₀-Fettsäure (?)
- 8 = α -Hydroxycerotinsäure

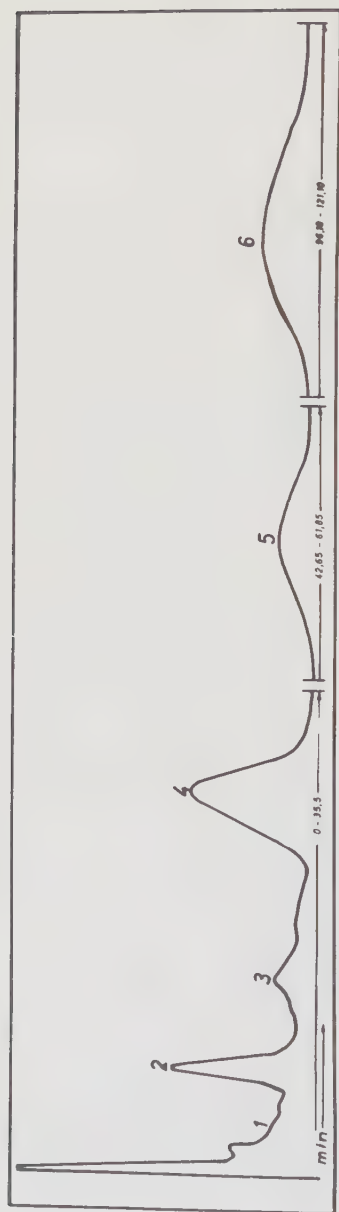


Abb. 29

Gaschromatographie der Fettsäuren des Saccharomycesmykoglykolipids an einer Polyestersäule

- 1 = Arachinsäure
- 2 = Behensäure
- 3 = Lignocerinäure

- 4 = Cerotinsäure
- 5 = α -Hydroxybehensäure
- 6 = α -Hydroxylignocerinäure

Alle Versuche, in den Mykoglykolipiden Hexosamin, Hexuronsäure oder Glycerin nachzuweisen, verliefen negativ. Außer den Sphingosinen konnten in den Candida- und Saccharomycesmykoglykolipiden keine ninhydrinpositiven Substanzen nachgewiesen werden.

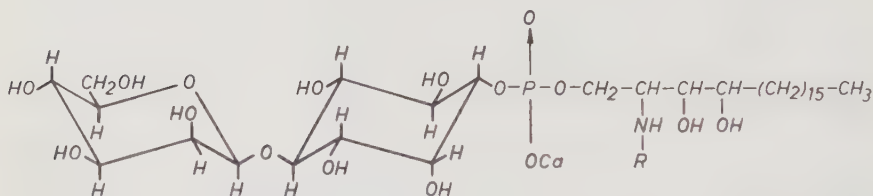
Der Nachweis eines Inositmonophosphats in den Candida- und Saccharomycesmykoglykolipiden macht für die Mykoglykolipide und für die Phytoglykolipide ein gemeinsames

C e r a m i d - P h o s p h a t - I n o s i t - Grundgerüst wahrscheinlich, an das verschiedene Zucker, wie Mannose bei den Mykoglykolipiden und Glukosamin, Glukuronsäure, Mannose, Galaktose und Arabinose bei den Erdnußphytoglykolipiden gebunden sind. Ceramid- und Saccharidanteil der Mykoglykolipide sind demnach wie bei den Phytoglykolipiden durch 1 Mol Phosphat miteinander verknüpft.

Unterschiede zwischen den beiden Mykoglykolipiden bestehen nur hinsichtlich der quantitativen Aminobasen- und Fettsäurezusammensetzung. Die Sphingosine des Candidamykoglykolipids bestehen aus 20.4 - 21.2% C₁₈-Phytosphingosin, 70.0 - 70.05% C₂₀-Phytosphingosin und 8.5 - 9.1% C₁₈-Dihydrosphingosin, die Sphingosine des Saccharomycesmykoglykolipids dagegen aus 32.0 - 34.7% C₁₈-Phytosphingosin, 55.0 - 57.5% C₂₀-Phytosphingosin und 10.0 - 11.2% C₁₈-Dihydrosphingosin.

Das Fettsäuremuster des Candidamykoglykolipids unterscheidet sich sehr deutlich von dem des Saccharomycesmykoglykolipids (Tab.21,S.69). Den Hauptanteil der Candidamykoglykolipidfettsäuren bilden die α -Hydroxylignocerinsäure (56.4%) und die α -Hydroxycerotinsäure (23.19%), während die Cerotinsäure (34.1%) und die α -Hydroxylignocerinsäure (36.20%) den des Saccharomycesmykoglykolipids ausmachen. α -Hydroxycerotinsäure kommt im Saccharomycesmykoglykolipid nicht vor (Tab.21,S.69). Das Fettsäuremuster kann mit zur Charakterisierung der beiden Mykoglykolipide herangezogen werden. Übereinstimmung herrscht dagegen zwischen den Mykoglykolipiden und Phytoglykolipiden darin, daß in keinem der genannten Sphingolipide ungesättigte Hydroxyfettsäuren vorkommen. Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide besitzen keinerlei ungesättigte Fettsäuren.

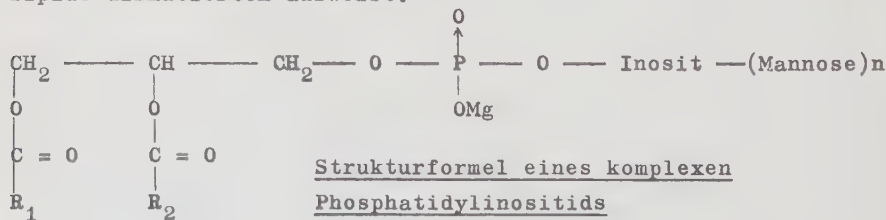
Neuere Untersuchungen der Flachssamenlipide durch CARTER haben zur Entdeckung eines hexosamin- und hexuronsäurefreien Phytoglykolipids geführt. Macht man sich die Carterschen Vorstellungen von der Struktur der Phytoglykolipide⁸⁵⁾ zueigen, so käme dem Hefemykoglykolipid eine gleiche Struktur zu, wie sie für das hexosamin- und hexuronsäurefreie Flachssphytoglykolipid diskutiert werden kann.



R = langkettige Fettsäure

Vermutliche Strukturformel der Hefemykoglykolipide

Durch die Arbeiten von VILKAS⁸⁷⁾⁸⁸⁾, LEDERER⁸⁹⁾, NOJIMA⁹⁰⁾ und PANGBORN⁹¹⁾ kennt man eine Reihe von phosphor- und hexosehaltigen Glyceroinositide aus Bakterien, deren Struktur große Ähnlichkeiten mit der von uns für die sphingoinhaltigen Mykoglykolipide diskutierten aufweist.



Strukturformel eines komplexen
Phosphatidylinositids

Wenn die isolierten inosithaltigen Mykoglykolipide allgemein für Pilze typisch sind und auch weiterhin in den Bakterien keine ähnlichen Verbindungen gefunden werden, ergäbe sich somit ein deutlicher Unterschied in der Zusammensetzung der komplexen Inositide der Pilze und der Bakterien. Dieser bestünde darin, daß die bakteriellen Inositide durchwegs glycerinhaltig sind, während die Mykoglykolipide an Stelle des Glycerins Sphingosinbasen besitzen. Die Frage, ob die beiden Typen komplexer Inositide sich in ihrem Vorkommen ausschließen, ist allerdings noch nicht mit Sicherheit zu beantworten. Dagegen bilden sowohl die Bakterien als auch die Pilze niedermolekulare, glycerinhaltige Monophosphoinositide. Die glycerin- und sphingosinhaltigen komplexen Inositide scheinen überwiegend mikrobiellen Ursprungs zu sein. Über ihre Existenz in Tieren und höheren Pflanzen ist, abgesehen von den Phytoglykolipiden, nichts bekannt. Sphingosinhaltige komplexe Inositide wie Phytoglykolipide und Mykoglykolipide wurden bisher nur aus Samen und Früchten höherer Pflanzen und aus Pilzen isoliert, während die komplexen Glycerininositide anscheinend nur im Gehirn⁹²⁾ und Bakterien existieren.

b) Die Cerebrine von Candida utilis-Hefe

Die Untersuchungen wurden an den Cerebrinen der Candidahefe vorgenommen. Ein nach den Angaben von PICARD⁹³⁾ aus "technischem Torulacerebrin" hergestelltes Cerebrinpräparat wurde mit Methanol extrahiert und der aus der methanolischen Lösung ausgefallene Niederschlag aus Äthanol umkristallisiert. Das Kristallisat bezeichneten wir als C e r e b r i n I .

Zur Gewinnung von C e r e b r i n II wurde ein mit Diäthyläther sterinfrei gemachtes Cerebrin mit Methanol extrahiert und der Rückstand des alkoholischen Extraktes aus Methanol umkristallisiert.

C e r e b r i n IV erhielten wir, indem wir das aus Methanol umkristallisierte "technische Torulacerebrin" in das Acetylderivat überführten und das nach Spaltung des Acetylproduktes angefallene Cerebrin mit Methanol und Aceton aus der Hülse extrahierten.

Zur Isolierung der Cerebrine aus der Droge wurde das Unverseifbare nach dem auf Seite 67 angegebenen Schema an einer Kieselgelsäule mit Chloroform-Methanolmischungen fraktioniert.

Die aus den gesammelten Eluaten gewonnene Substanz stellte ein Gemisch aus verschiedenen Candidacerebrinen dar.

Die CH- und Stickstoffwerte der einzelnen Cerebrine wiesen keine größeren Abweichungen auf. Sämtliche isolierten Cerebrine waren phosphorfrei. Die erhaltenen Cerebrine unterschieden sich in ihren Schmelzpunkten. Cerebrin I besaß einen Schmelzpunkt von $135 - 136.5^{\circ}\text{C}$, Cerebrin II einen von $135 - 137.7^{\circ}\text{C}$ und Cerebrin IV einen von $144 - 145^{\circ}\text{C}$. Der Schmelzpunkt des aus der Candida-Hefe isolierten Cerebringemisches betrug $139 - 140^{\circ}\text{C}$.

Die Fettsäuren der einzelnen Cerebrine bestanden im wesentlichen aus Cerebronsäure und Hydroxycerotinsäure.

Der Sphingosingehalt der untersuchten Cerebrine schwankte in den Grenzen von 45.36 - 48.0%. Berechnet wurde der Sphingosingehalt der Cerebrine zu 46.5%. Cerebrin I besaß einen Sphingosingehalt von 48.0%, Cerebrin II einen solchen von 46.46% und die aus der Candida-Hefe isolierten Cerebrine (Smp. $139 - 140^{\circ}\text{C}$) einen von 45.36%.

Die verschiedenen Sphingosinanteile setzten sich gleichermaßen aus C_{18} -Phytosphingosin, C_{20} -Phytosphingosin und C_{18} -Dihydro-sphingosin zusammen. Über die prozentuale Verteilung der einzelnen Aminobasen im Sphingosingemisch gibt die nachfolgende Tabelle Aufschluß.

T a b e l l e 22

Die Zusammensetzung des Sphingosinanteils verschiedener Candidacerebrine

Cerebrin	Smp. o	% C_{18} -Phyto- sphingosin	% C_{20} -Phyto- sphingosin	% C_{18} -Dihydro- sphingosin
Candidacerebrin I	135-136.5	25.05	53.75	16.22
Candidacerebrin II	135-137.7	28.75	60.25	11.32
Candidacerebrin IV	144-145	29.1	68.00	6.00

C_{20} -Phytosphingosin ist die Hauptkomponente aller Sphingosin-gemische. Etwa 6 - 17% der Cerebrinsphingosine werden von der C_{18} -Dihydrosphingosinbase gebildet.

Die isolierten Cerebrine stellen Gemische aus mindestens 3 - 4 Komponenten dar, die sich in ihren Konzentrationen voneinander unterscheiden. Bei Chromatographie auf Kieselgel-G-Platten im Fließmittel Chloroform-Methanol (9:1) trennte sich ein Gemisch von Cerebrinen vom Schmelzpunkt $144 - 145^{\circ}C$ in drei Fraktionen mit den R_f -Werten 0.65; 0.52 - 0.44; und 0.33 - 0.28 (Abb. 30).

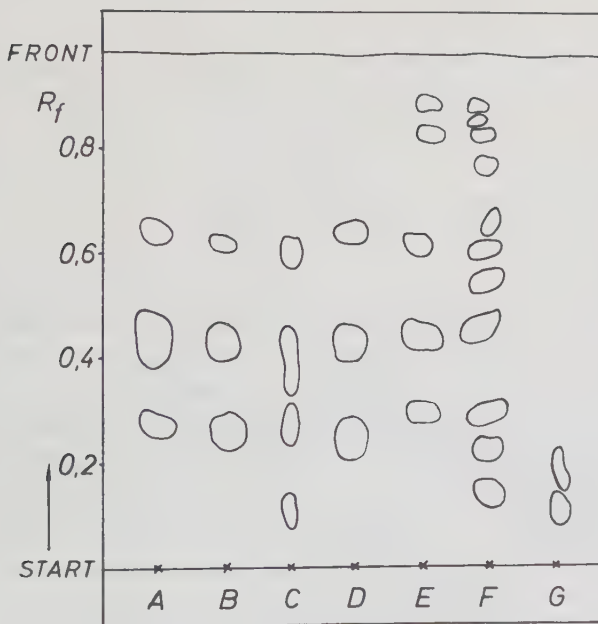


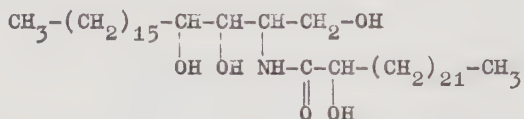
Abb. 30

Dünnschichtchromatographie der Cerebrine - Kieselgel-G
Fließmittel: $CHCl_3$ -MeOH (9:1)

A = Candidacerebrine IV
B = Candidacerebrine aus *Candida utilis* isol.
C = technisches *Torulacerebrin* m. Äther extrahiert
D = Candidacerebrine II
E = Sphingolipidfraktion aus *Saccharomyces* hefe
F = Sphingolipidfraktion aus *Candida* hefe
G = Rinderhirncerebroside

Das aus *Candida utilis* isolierte Cerebringemisch vom Schmelzpunkt 139 - 140° bestand ebenfalls aus mindestens drei Komponenten (Abb. 30, S. 77). Die Hauptkomponente der *Candida*- und *Saccharomycescerebrine* befand sich im R_F -Bereich von 0.52 - 0.42. Die Cerebrinfraktionen der *Candida*- und *Saccharomyceshefe* dürften nach dem Dünnschichtchromatogramm weitgehend ähnlich zusammengesetzt sein (Abb. 30). Die *Candidahefe* scheint allerdings einige Cerebrine mehr als die *Saccharomyceshefe* zu besitzen.

Den Cerebrinen kommt folgende allgemeine Struktur zu, die aus dem nachfolgend als Beispiel aufgeführten Cerebrin aus C_{20} -Phytosphingosin und Cerebronsäure ersichtlich ist.



Struktur eines Hefecerebrins

Die Cerebrine I - IV unterschieden sich in ihren CH-Werten, ihrem Stickstoff- und Sphingosingehalt, in der qualitativen Zusammensetzung ihrer Sphingosinanteile, in ihren Löslicheitseigenschaften und ihrem chromatographischen Verhalten praktisch nicht voneinander. Das aus der Droge isolierte Cerebrin entsprach in seinen CH-Werten, seinem Stickstoff- und Sphingosingehalt, seinem Schmelzpunkt und seinem chromatographischen Verhalten ganz den aus dem "technischen *Torulacerebrin*" gewonnenen Cerebrinen.

Den isolierten Cerebrinen sind nach unseren Untersuchungen die Bruttoformeln

$C_{46}H_{93}O_5N$ (740.2) und $C_{44}H_{89}O_5N$ (712.2) zuzuschreiben.

Die Bruttoformeln waren auf Cerebrine aus aequimolaren Mengen C_{18} - bzw. C_{20} -Phytosphingosinen und längerkettigen Hydroxyfettsäuren (Cerebronsäure und Hydroxycerotinsäure) berechnet.

Die einzelnen Cerebrinpräparate stellten Gemische aus verschiedenen, in ihren Konzentrationen unterschiedlichen Cerebrinen dar. Die Schmelzpunkte der Cerebrine, die stark von der Wahl der Isolierungsmethode und wahrscheinlich von der Zusammensetzung der Cerebringemische abhängig sind, liegen im Bereich von 135 - 145°.

C₁₈-Dihydrosphingosin konnte erstmals in den Hefecerebrinen nachgewiesen werden. Seine Existenz ist durch eingehende dünnschicht- und gaschromatographische Untersuchungen gesichert. Wie unsere Untersuchungen außerdem ergeben haben, lassen sämtliche Hefecerebrine ungesättigte Sphingosinbasen wie Dehydrophyto- oder Dehydrosphingosinbasen vermischen. Die qualitativ ähnlich zusammengesetzten Sphingosingemische der verschiedenen Hefecerebrine ließen sich durch Ermittlung ihrer quantitativen Zusammensetzung noch weiter differenzieren. Das C₂₀-Phytosphingosin war in allen untersuchten Cerebrinen am stärksten vertreten (Tab.22, S.76). C₁₈-Phytosphingosin und C₁₈-Dihydrosphingosin lagen jeweils in geringerer Konzentration vor. Damit unterscheiden sich die einzelnen Cerebrine vor allem in der prozentualen Verteilung ihrer Sphingosinbasen.

Die Sphingosinbasenanteile der Cerebrine der Candida- und Saccharomyceshefen und der Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide wiesen eine ähnliche Zusammensetzung aus C₁₈- und C₂₀-Phytosphingosinen und C₁₈-Dihydrosphingosin auf. Die Fettsäuren der Cerebrine, Cerebronsäure und Hydroxycerotinsäure, sind ebenfalls in den Hefemykoglykolipiden zu finden. Die weitgehende Übereinstimmung der in den Hefen entdeckten Cerebrine, Cerebrinphosphate⁶⁶⁾ und phosphorhaltigen Sphingoglykolipide im Aufbau ihrer Sphingosin- und Fettanteile läßt eine entscheidende Mitwirkung der Cerebrine und Cerebrinphosphate bei der Biosynthese phosphorhaltiger Sphingolipide, wie der Mykoglykolipide vermuten. Sie dürften als Zwischenstufen bei der Biosynthese der Mykoglykolipide auftreten.

Das Cerebrin, das bislang einzige bekannte Hefesphingolipid, ist vermutlich genuiner Bestandteil der Pilzlipide. Das Cerebrin, dessen Struktur und Zusammensetzung REINDEL²⁵⁾⁹⁴⁾, RUPPOL²⁷⁾²⁸⁾, CHIBNALL⁹⁵⁾, PROSTENIK³²⁾ und KISIC⁶⁷⁾ näher untersuchten, ist

bisher ausschließlich aus höheren und niederen Pilzen isoliert worden. Es scheint ein typischer Pilzinhaltsstoff zu sein. Über die Existenz von Cerebrinen in anderen Mikroorganismen ist nichts bekannt. Das Cerebrin wurde bereits früher von mehreren Autoren aus ätherischen oder alkoholischen Auszügen höherer⁹⁶⁾⁻¹⁰²⁾ und niederer²⁶⁾³⁰⁾¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾²⁸⁾²⁹⁾ Pilze, in denen es in reichlicher Menge vorzukommen scheint, erhalten. Es wurde erstmals von REINDEL²⁵⁾⁹⁴⁾ unter den Lipiden einer Hefe aufgefunden. RUPPOL²⁸⁾²⁷⁾, BOHONOS²⁶⁾, ODA³⁰⁾ und WIELAND¹⁰³⁾ fanden Cerebrine auch in anderen Pilzen.

Trotz der relativ guten Kenntnisse über Vorkommen und Struktur der Cerebrine ist ihre Rolle im Stoffwechsel der Pilze noch völlig unbekannt.

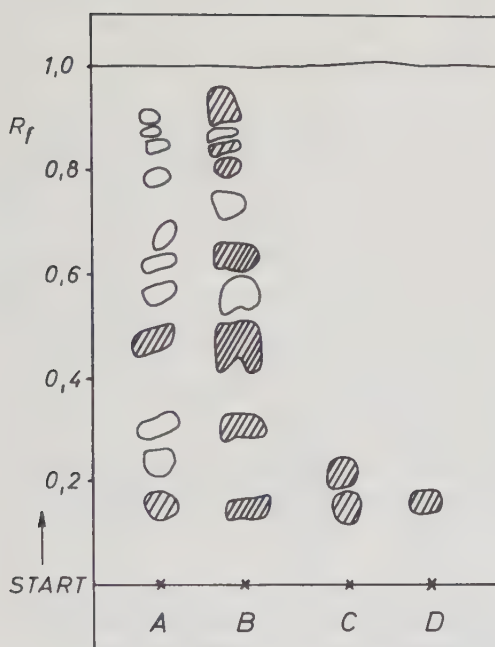
c) Das Cerebrosid der Candida utilis-Hefe

Bei der dünn-schicht-chromatographischen Untersuchung der Sphingolipidfraktionen der Candida utilis-Hefe war eine Substanz aufgefallen, die in ihrem R_f -Wert mit einem unveresterten Rinderhirncerebrosid übereinstimmte (Abb. 31, S.81). Der chromatographische Nachweis in der entsprechenden Fraktion der Saccharomyces-hefe konnte nicht erbracht werden.

Wir fraktionierten dieses "Cerebrosid" aus einem Sphingolipid-extrakt der Candida utilis-Hefe durch Kieselgelsäulenchromatographie mit Chloroform-25% Methanol als Laufmittel heraus (siehe Schema S. 67) und gewannen in 4.38%iger Ausbeute eine Substanz, die kristallisierte und sich gegen Alkalien stabil erwies.

Beim dünn-schicht-chromatographischen Vergleich des isolierten Candida-cerebrosids (Abb.31, S.81 und Tab. 23, S.81) mit einem Gemisch der unveresterten Rinderhirncerebroside besaß das Hefecerebrosid einen mit einem der Rinderhirncerebroside gleichen R_f -Wert.

Abb. 31



Dünnschichtchromatographie des Candidacerebrosids

Kieselgel-G

Fließmittel: CHCl_3 -MeOH
(9:1)

A = Sphingolipidfraktion aus Candidahefe

B = Alkoholextrakt der Sphingolipidfraktion aus Candidahefe

C = Rinderhirncerebroside

D = aus Candida utilis isoliertes Cerebroside

Tabelle 23

Chromatographischer Vergleich von Candidacerebroside mit Rinder-
cerebroside auf aktivierten Kieselgel-G-Platten

Cerebroside	CHCl_3 -MeOH (9:1)	CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4)	CHCl_3 -MeOH- H_2O (60:35:8)
Candidacerebroside, R_f -Wert	0.15	0.66	0.72
Rinderhirncerebroside, R_f -Werte	0.19- 0.23	0.69	0.74
	0.13	0.65- 0.66 0.60- 0.57	0.70

Das Candidacerebrosid ließ sich wie die Rinderhirncerebroside mit Rhodamin-B-Lösung, Nilblaulösung und mit dem Bialschen Reagens anfärben. Mit dem Liebermann-Burchardschen Reagens zeigte es keine Reaktion, so daß Sterolglykoside mit Sicherheit auszuschließen waren.

Die IR-Banden bei $3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$, 1670 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} , $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ und 960 cm^{-1} sind typisch für ein zuckerhaltiges Sphingolipid.

Das Candidacerebrosid war in Pyridin sehr gut löslich. Es löste sich außerdem gut in Chloroform und Methanol-Chloroformgemischen. In der Hitze löste es sich auch in Alkohol und fiel beim Abkühlen wieder aus. Das Candidacerebrosid ging bei $150 - 160^{\circ}\text{C}$ in einen flüssig-kristallinen Zustand über und schmolz endgültig bei einer Temperatur von $213 - 214^{\circ}\text{C}$. Nach saurer Hydrolyse des Candidacerebrosids ließ sich papierchromatographisch Galaktose nachweisen, die nach der Methode von MALLOV⁷⁷⁾ quantitativ bestimmt wurde (Tab. 24)

T a b e l l e 24

Quantitative Bestimmung der Galaktose und der Sphingosine des Candidacerebrosids

	% Galaktose	% Sphingosine
ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{83}\text{NO}_9$	24.1	38.1
ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{79}\text{NO}_9$	25.1	38.4
gef. (Mittelwerte)	28.92	37.08

aus

Die Sphingosine des Candidacerebrosids setzen sich C_{16} - und C_{18} -Dihydrosphingosin und einer dritten ungesättigten Sphingosinbase mit noch unbekannter Struktur zusammen. Die Existenz dieser dritten Base konnte durch die Dünnschichtchromatographie, durch Hydrierung, durch oxydative Abbaureaktionen und einer im IR-Spektrum auftretenden trans-Doppelbindungsbande bei 960 cm^{-1} bewiesen werden. Nach den dünn-schicht- und gaschromatographischen Ergebnissen könnte ein den bekannten tierischen, einfach ungesättigten Aminobasen identisches oder ähnliches Sphingosin vor-

liegen. Der R_f -Wert der ungesättigten Sphingosinbase des Candidacerebrosids ist identisch mit dem des C_{18} - bzw. C_{20} -erythro-Sphingosins.

Für das Candidacerebrosid bestimmten wir einen Sphingosingehalt von 37.08% (Tab. 24).

Der Fettsäureanteil des Candidacerebrosids war α -Hydroxystearinsäure (Abb. 32).

Die Reaktion auf Phosphor und Schwefel war negativ.

Die auf Grund der ermittelten CH-Werte für das Candidacerebrosid errechneten Bruttoformeln



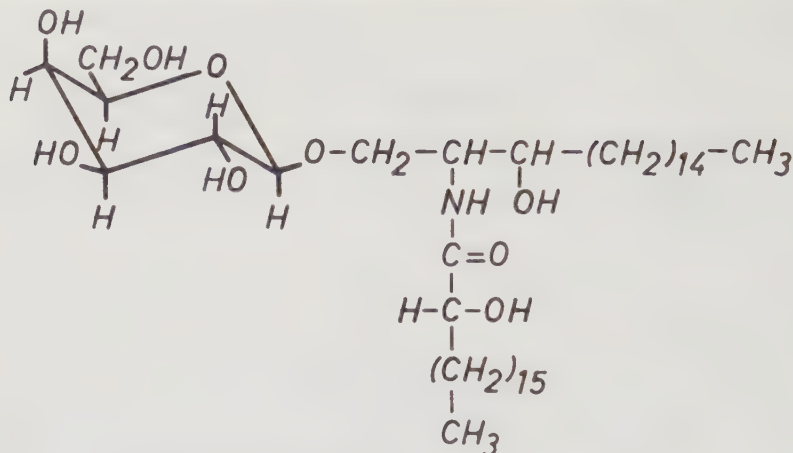
entsprechen einem aus aequimolaren Mengen α -Hydroxystearinsäure, C_{16} - bzw. C_{18} -Dihydrosphingosin und Hexose bestehendem unveresterten Cerebrosid. Das isolierte Candidacerebrosid weist demnach die Struktur eines unveresterten α -Hydroxystearoyl- $(C_{16}$ -, C_{18} -)-dihydrosphingosinmonogalaktosids vom Molekulargewicht 746.1 bzw. 718.0 auf.



Abb. 32

Gaschromatographie der Fettsäure des Candidacerebrosids an einer Apiezonssäule

Dem Cerebrosid kommt folgende Strukturformel zu:



Strukturformel des Candidacerebroside

Das Candidacerebrosid gleicht in Struktur und Zusammensetzung vollkommen den tierischen Cerebrosiden. Wie letztere besitzt das Candidacerebrosid durchwegs Aminodiole und keine der sonst den Hefesphingolipiden eigenen Aminoatriole. Außerdem enthält es wie der überwiegende Teil der tierischen Cerebroside 1 Mol Galaktose pro Mol Cerebrosid.

Das Candidacerebrosid weist große Ähnlichkeit mit einem von CARTER (1951) (1952) erstmals aus Weizenmehl isolierten Cerebrosid auf. Dieses setzt sich aus α -Hydroxystearinsäure, Glukose und einem wahrscheinlich vorwiegend aus Dihydrosphingosin bestehendem Sphingosinanteil zusammen. Neben Dihydrosphingosin, Phytosphingosin und einer kleinen Menge Dehydrophytosphingosin entdeckte CARTER (1951) unter den Sphingosinen der Cerebrosidfraktion eine ungesättigte Base, deren Struktur sich nicht genau bestimmen ließ. Nach Ansicht von CARTER handelt es sich um ein Aminodiol mit isolierter Doppelbindung, d.h. ein Doppelbindungsisomeres des 2-Amino-1,3-dihydroxy-4-trans-octadecen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch im Candidacerebrosid dieses Aminodiol enthalten ist. Das aus Candidahefe isolierte Cerebrosid stellt das bisher einzige bekannte phosphorfreie zuckerhaltige Sphingolipid der Mikroorganismen dar. Ein Cerebrosid in den Viren der Influenzagruppe konnte von BEISS und ARMBRUSTER (1951) bisher nur papierchromatographisch festgestellt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Sphingosine

I. Allgemeine Methoden zur Isolierung, zum Nachweis, zur Strukturaufklärung und zur quantitativen Bestimmung der Sphingosine

1. Methoden zur Isolierung und Reindarstellung der Sphingosine

Bariumhydroxydhydrolyse: 1 Teil reines Sphingolipid oder Glykosphingolipid wurde nach einer Vorschrift von CARTER³⁸⁾ mit 100 Teilen gesättigter Bariumhydroxydlösung behandelt und aus dem Hydrolysat die Sphingosine gewonnen.

Hydrolyse mit Bariumhydroxyd und Salzsäure nach McKIBBIN und TAYLOR³⁹⁾: 180 mg Sphingolipid oder Glykosphingolipid hydrolysierten wir nach der Methode von McKIBBIN und TAYLOR unter sechsständigem Rückflußkochen mit 50 ml gesättigter Bariumhydroxydlösung und anschließend 2 Stunden lang mit 5 ml konz. Salzsäure (32 Vol.%) bei 100°C. Aus dem Hydrolysat gewannen wir die Rohsphingosinbasen.

Schwefelsäure Hydrolyse: 1 Teil Sphingolipid oder Glykosphingolipid hydrolysierten wir nach einer Vorschrift von CARTER³¹⁾ durch sechsständiges Rückflußkochen mit der 20-fachen oder 40-fachen Menge 5%-iger methanolischer Schwefelsäure und isolierten aus dem Hydrolysat die Sphingosinbasen.

Salzsaure Hydrolyse: 1 Teil Sphingolipid oder Glykosphingolipid hydrolysierten wir nach einer Vorschrift von SWEETLEY und MOSCATELLI⁴⁰⁾ durch sechsständiges Rückflußkochen mit der 100-fachen Menge 2 n methanolischer Salzsäure. Aus dem alkalisierten Hydrolysat schüttelten wir mit Äther die Sphingosinbasen aus.

Zur Reinigung der Rohsphingosinbasen bedienten wir uns nachfolgend beschriebener Methoden.

Reinigung der Sphingosinbasen unter Verwendung ihres Sulfats³¹⁾

500 mg Rohbasen lösten wir in 15 ml absolutem Äthanol, filterten die Lösung und versetzten das Filtrat bis zur schwachen Bläuung des Kongorotpapieres mit kleinen Portionen 1 n methanolischer Schwefelsäure. Nach 2-stündigem Stehen des Ansatzes bei 3° erhielten wir 290 mg eines fast weißen, amorphen Sphingosinsulfates. Durch Behandeln von 280 mg des Sulfates mit 5 ml 5%-iger Kaliumhydroxydlösung wurde das Derivat zersetzt, die alkalische Lösung mehrmals mit der zweifachen Menge Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherphasen mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel abgeengt. Den Rückstand suspendierten wir in 15 ml kochendem Hexan und versetzten bis zur Klärung tropfenweise mit Methanol. Die Lösung ließen wir zuerst 1 Stunde lang bei Raumtemperatur und anschließend 3 Stunden lang in der Kälte stehen. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals in gleicher Weise umkristallisiert.

Reinigung der Sphingosinbasen über ihre Acetonderivate

100 mg Rohsphingosinbasen lösten wir in 5 ml kochendem Aceton und ließen die Lösung auf 4° abkühlen. Nach 12 Stunden konnten 40 mg kristalliner Niederschlag abfiltriert werden. Nach mehrmaliger Umkristallisation aus Aceton erhielten wir 28 mg Acetonverbindung mit einem Schmelzpunkt von 114 - 116.5° (nach Kofler, unkor.). Die gesamte Menge Acetonderivat lösten wir in einem Überschuß warmen Methanols, säuerten mit 1/10 n methanolischer Salzsäure an und ließen den Ansatz mehrere Stunden lang stehen. Die auf 1/4 ihres Volumens eingeengte Lösung stellten wir zur Kristallisation beiseite. Die auskristallisierten Sphingosinbasen wurden noch zweimal aus Methanol umkristallisiert.

Reinigung der Sphingosinbasen mittels Säulenchromatographie⁴⁰⁾

1 Teil Kieselgel für Chromatographie, Merck 0.2-0.5 mm schlammten wir mit der 100-fachen Menge einer Mischung aus Chloroform p.a.-Methanol p.a. (4:1) in eine Glassäule entsprechender Größe ein. Wir wuschen das eingeschlammte Material mit der 50-fachen Menge der gleichen Lösungsmittelmischung und behandelten es bis zur Transparenz mit Chloroform p.a.. Zur Reinigung von je 10 mg

Basengemisch verwendeten wir 2 g Kieselgel. Die langkettigen Basen brachten wir in 1-3 ml Chloroform gelöst auf die präparierte Säule auf, eluierten die Fettsäureester mit einem der 10-fachen Menge des Füllmaterials entsprechenden Quantum Chloroform p.a. und die Sphingosinbasen mit der 15-fachen Menge einer Mischung aus Chloroform und Methanol (1:4). Nach Abengen des Lösungsmittels und Gefriertrocknung des Rückständen erhielten wir die trocknen und reinen Sphingosinbasen.

Reinigung der Sphingosinbasen durch Kristallisation

Die Sphingosinbasen kristallisierten wir entweder wiederholt aus peroxydfreiem Äther und Methanol um oder lösten sie in der 50-fachen Menge kochendem Methanol auf, ließen die Lösung über Nacht abkühlen, filtrierten den Niederschlag ab, engten das Filtrat auf $\frac{1}{3}$ seines ursprünglichen Volumens ein und stellten das Konzentrat zur Kristallisation beiseite. Die Sphingosinbasen wurden mehrmals in gleicher Weise umkristallisiert.

2. Methoden zum chromatographischen Nachweis, zur Strukturaufklärung und zur quantitativen Bestimmung einzelner Sphingosine

I. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Sphingosine und Phytosphingosine

Methodik: Etwa 300 μ dicke Adsorptionsschichten von Kieselgel-G für Dünnschichtchromatographie Merck oder Kieselgel-G Merck + Kieselgur-G Merck (1:1) brachten wir auf Spiegelglasplatten der Dimension 12 x 20 cm bzw. 20 x 22 cm auf. Pro Platte wurde eine Aufschlammung von 5 g Adsorptionsmaterial in 10 ml destilliertem Wasser verwendet. Die zur Aktivierung 20 Minuten lang im Trockenschrank auf 110° erhitzten Adsorptionsschichten gelangten nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur sofort zur Verwendung. Nicht zu aktivierende Adsorptionsschichten ließen wir 3-4 Stunden lang bei Raumtemperatur trocknen. 30-50 μ g Sphingosine wurden in Chloroform, Äther oder Chloroform-Methanollösungen gelöst mit einer Blutzuckerpipette oder einer Glaskapillare auf die Startpunkte,

die 1.5 cm vom unteren Plattenrand entfernt waren, aufgebracht. Bei der präparativen Dünnschichtchromatographie trugen wir 100-150 μg Substanz als etwa 1 cm lange Striche auf die Startlinie auf.

Laufmittelsysteme und Entwicklung der Platten

Sämtliche zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittelsysteme waren einphasig, völlig klar und wurden vor Gebrauch frisch angefertigt. Das zur Bereitung der Laufmittel dienende Chloroform wurde nach WOHLLEBEN durch Behandeln mit basischem Aluminiumoxyd, Akt.-st.-I Woelm gereinigt. Das verwendete Methanol wurde zuerst mit Bariumoxyd am Rückfluß gekocht, abdestilliert, mit metallischem Calcium versetzt und anschließend fraktioniert destilliert. Das einige Stunden mit Pottasche am Rückfluß gekochte Aceton wurde nach dem Abgießen über einer kleinen Menge frischen Trockenmittels fraktioniert destilliert. Außerdem verwendeten wir Äthanol 96%ig, handelsüblich, Eisessig 96%ig rein, Riedel de Haën und Diisobutylketon rein, Schuchardt.

Nach zwölfstündigem Äquilibrieren der mit Lösungsmittel getränkten Papierstreifen ausgekleideten Chromatographierkammer entwickelten wir die Dünnschichtplatten. Die Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme sowie ihre anschließende Trocknung nahmen wir bei Zimmertemperatur vor. Das Trocknen der Adsorptionsschicht wurde durch kurzzeitiges Beföhnen mit Kaltluft beschleunigt.

Zur Durchführung des zweidimensionalen Verfahrens dienten uns Glasplatten der Dimension 20 x 22 cm.

Zusammensetzung der einzelnen Fließmittel:

a) Eindimensionales Verfahren

1. $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:25:4; v/v) ¹⁰⁸⁾
2. $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:30:5; v/v)
3. $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:22:3; v/v)
4. $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (4:1; v/v) ⁵²⁾
5. $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_3$ (34.35 Gew.-%) (4:1:0.1; v/v)
6. Diisobutylketon-Eisessig-Wasser (40:25:5; v/v)
7. Chloroform-Aceton (2:1; v/v) ⁵²⁾

Bei einer Laufhöhe des Fließmittels von 14-16 cm betrug die Laufzeit der Kieselgel-G-Platten in den Fließmitteln 1,2,3,4,5 und 7 1 1/2 - 2 Stunden, in dem Fließmittel 6 etwa 2 Stunden.

b) Zweidimensionales Verfahren

Zur Auftrennung der Sphingosine und Phytosphingosine nach dem zweidimensionalen Verfahren wurden die Fließmittel 1,3 und 4 in entsprechender Weise kombiniert.

Anfärbeverfahren

1. Ninhydrinreagens¹⁰⁸⁾:

Besprühen der entwickelten, vom Laufmittel befreiten Dünnschichtplatten mit einer 0.2%igen essigsäuren, butanolischen Ninhydrinlösung und 15minütiges Erhitzen auf 110⁰. Dabei erschienen die Sphingosine als rotviolette Flecke auf weißem bis gelblichweißem Untergrund, die Derivate der Sphingosine, wie die O-Methyläther und die Abbauprodukte der Basen als gelbe bis gelbrote, an der Luft allmählich eine rötliche oder rotviolette Farbe annehmende Flecke. Deren Farbtiefe ließ sich durch zusätzliches kurzes Behandeln der besprühten und erhitzten Platten mit Wasserdampf noch verstärken. In einer Modifikation des Anfärbeverfahrens ließen wir die besprühten Kieselgelplatten an Stelle der Hitzebehandlung etwa 5 Stunden an der Luft liegen. Die Sphingosine erschienen wiederum als rotviolette Flecken, während die O-Methyläther der Sphingosine eine gelbe, nach längerer Zeit in Rotviolett übergehende Farbe annahmen.

2. Bromthymolblaureagens¹⁰⁹⁾:

Besprühen der getrockneten Platten mit einer Lösung von 40 mg Bromthymolblau in 100 ml 0.01 n wässriger NaOH. Sämtliche Sphingosine erschienen als gelbliche Flecken. In Ammoniakatmosphäre nahmen sie eine dunkelblaue Farbe an, die sich vom hellblauen Untergrund gut abhob.

3. Rhodamin-B-Lösung¹⁰⁸⁾: Besprühen der Kieselgelplatten mit einer 0.05%-igen alkoholischen Rhodamin-B-Lösung. Die Sphingosinbasen erschienen als Flecken von kräftig hellroter Farbe

auf blaßrosa Untergrund. Nach Verdunsten des Alkohols zeigten die Flecken unter dem UV-Licht (Wellenlänge der UV-Lampe: 360 m μ) eine deutliche rote Fluoreszenz.

4. Phosphormolybdänsäurereagens¹¹⁰⁾:

Besprühen der Kieselgelplatten mit einer 10%igen äthanolischen Phosphormolybdänsäurelösung und anschließendes 15-20-minütiges Erhitzen im Trockenschrank auf 120°C. Die Sphingosine erschienen dabei als graublaue Flecken auf graugrünem Untergrund.

5. Fluoreszeinlösung:

Besprühen der Kieselgelplatten mit einer 0.2%igen äthanolischen Fluoreszeinlösung. Die Sphingosine zeigten unter dem UV-Licht (Wellenlänge der UV-Lampe: 350 m μ) eine hellgrüne Fluoreszenz.

6. Cyclodextrinreagens¹¹¹⁾:

Die mit einer 1%igen Lösung von α -Dextrin in 30%igem Äthanol besprühten Dünnschichtchromatogramme brachten wir nach einer Stunde Lufttrocknung in eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre. Die feuchten Chromatogramme behandelten wir anschließend mit Joddampf. Auf purpurnem Untergrund erschienen gesättigte Verbindungen als weiße Flecke, während die ungesättigten Verbindungen gelbe bis bräunliche Flecke bildeten.

7. Reaktion mit Jod und Osmiumtetroxy:

Die Kieselgelplatten wurden für 20-30 Minuten in ein mit Jod- oder Osmiumtetroxyddampf gesättigtes Gefäß gebracht. Die ungesättigten, gut anfärbbaren Sphingosinbasen hoben sich von den gesättigten Verbindungen, die sich nur schwach anfärbten, deutlich ab. Die Sphingosinbasen traten als scharf voneinander abgegrenzte Flecke in Erscheinung. Die mit Joddampf behandelten Platten sind wie die mit Ninhydrinreagens angefärbten Platten am besten im Durchlicht zu betrachten.

Präparative Dünnschichtchromatographie der Sphingosine und Phytosphingosine

- a) Die in verschiedenen Laufmittelsystemen entwickelten Kieselgelplatten (Kieselgel-G Merck; Schichtdicke: 300 μ) färbten wir nach vorangegangener Trocknung mit Bromthymolblaulösung an.

Die gewünschten Substanzen kratzten wir mit einem feinen Spatel aus der Adsorptionsschicht aus. Die anschließende Eluierung der Sphingosine nahmen wir mit Methanol oder Aceton vor. Das von den Platten entnommene Kieselgel wurde mehrmals bei Raumtemperatur mit den Lösungsmitteln ausgeschüttelt. Die durch Bromthymolblau gefärbte Lösung behandelten wir mit einer Spur Aktivkohle und erhielten so ein klares, ungefärbtes Filtrat. Bei Eluierung des Adsorbens mit Aceton wurde kein Farbstoff mitgelöst. Die methanolischen bzw. acetonischen Extrakte gaben wir im Bedarfsfall zur vollkommenen Reinigung über eine Kieselgelsäule.

- b) In Abwandlung der vorstehend beschriebenen Methode verwendeten wir eine Bahn der Platte als Leitchromatogramm. Auf dieses trugen wir einen äquivalenten Teil des zu trennenden Sphingosingemisches auf. Durch Entfernung eines dünnen Streifen Kieselgels unterbrachen wir nach Entwicklung des Chromatogrammes die Adsorptionsschicht zwischen Leitchromatogramm und der übrigen Kieselgelschicht, die wir durch eine Glasplatte abdeckten. Die freiliegende Schicht färbten wir mit Ninhydrinreagens an und ließen sie zur Entwicklung des Substanz-Farbstoffkomplexes 5 Stunden lang an der Luft liegen. Die Lage der Sphingosinbasen konnte mit Hilfe des Leitchromatogramms bestimmt werden. Die gewünschten Sphingosinbasen wurden frei von Farbstoff aus der Kieselgelschicht isoliert. Mit dieser Methode konnten wir das Gemisch der C₁₈- und C₂₀-Phytosphingosine des Hefecerebrins und das Phytosphingosin und Dehydrophytosphingosin des Erdnußphytoglykolipids rein gewinnen.

Herkunft der Testsubstanzen

C₂₀-Phytosphingosin, isoliert

C₁₈- und C₂₀-Sphingine, synthet.

C₁₈-Dihydrosphingosin, synthet.

N-Acetylsphingosin

DL-erythro-C₁₈-Sphingosin, synthet.

C₁₈-Dihydrosphingosin, synthet.

Prof.Dr.M.PROSTENIK, Chemisches Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Zagreb und Institut "Ruder Boskovic", Biochemische Abteilung, Zagreb

Prof.Dr.C.A.GROB, Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel

Prof.Dr.D.SHAPIRO, Weizmann Institut der Wissenschaften, Rehovoth

Anhydrophytosphingosin	aus Hefecerebrinphytosphingosinen isoliert
C ₁₈ - und C ₂₀ -Phytosphingosine	nach präparativer Dünnschichtchromatographie des Hefecerebrinsphingosingemisches isoliert
O-Methyläther der Sphingosine	nach einer Vorschrift von CARTER ¹⁴) dargestellt
C ₁₈ -Sphingosin	durch Hydrolyse des N-Acetylsphingosins
threo-C ₁₈ -Sphingosin	durch mehrstündiges Rückflußkochen von isoliertem erythro-Sphingosin mit methanolischer Schwefelsäure

II. Papierchromatographischer Nachweis der Sphingosine und Phytosphingosine

Zum papierchromatographischen Nachweis der Sphingosine und Phytosphingosine verwendeten wir das Verfahren von PALAMETA und PROSTENIK⁵¹). Chromatographie der Sphingosine auf Silicagelpapier (Silicagelpapier Schleicher u. Schüll 289) im Fließmittel Diisobutylketon-Eisessig-Wasser (40:25:5; v/v). Laufzeit der Chromatogramme: 6 1/2 Stunden; Laufhöhe des Fließmittels 21 cm. Anfärbung der Chromatogramme mit 0.2%iger essigsaurer, butanolischer Ninhydrinlösung.

Die Sphingosine der tierischen Sphingolipide chromatographierten wir nach Umwandlung in ihre Dinitrophenyllderivate nach dem Verfahren der Umkehrphasenchromatographie auf mit Tetralin hydrophobiertem Papier (Schl. u. Sch. 2043 b) im Laufmittelsystem Methanol-Triäthylamin-Wasser (85:5:10; v/v)⁴⁶). Die Dinitrophenyllderivate der Sphingosine fluoreszieren unter dem UV-Licht gelb. Laufzeit der Chromatogramme bei Zimmertemperatur und abgesättigter Kammer: 14-15 Stunden. Laufhöhe des Fließmittels: 24 cm.

III. Gaschromatographie der aus den Sphingosinen und Phytosphingosinen durch Chromsäure- und Perjodsäureoxydation erhaltenen Aldehyde und Carbonsäuren

a) Säureabbau:

Der Chromsäureabbau der Sphingosine wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von MAJDFER-ORESCANIN und PROSTENIK⁵⁵⁾ durchgeführt.

100 mg Sphingosinbasen wurden in 6 ml 96%ig. Eisessig gelöst und mit 2 ml einer 10%igen Chromtrioxydlösung in Eisessig versetzt. Den Ansatz erhitzen wir eine Stunde lang bei 60°C. Das abgekühlte Reaktionsgemisch verdünnten wir mit der doppelten Menge Wasser und extrahierten dreimal mit 2 Volumen peroxydfreiem Äther. Die ätherischen Lösungen wurden durch mehrmalige Behandlung mit Wasser säurefrei gewaschen und mit 1/2 Volumen 10%iger Sodalösung ausgeschüttelt. Die mit Wasser neutral gewaschenen Ätherlösungen wurden zur Entfernung vorhandener Aldehyde kurz mit 1/3 ihres Volumens 5%iger Natriumbisulfitlösung behandelt. Die nach Verdunsten der getrockneten Ätherphase verbliebenen Fettsäuren versetzten wir mit einem großen Überschuß an frisch bereiteter ätherischer Diazomethanlösung und ließen das Reaktionsgemisch über Nacht stehen. Die veresterten Fettsäuren nahmen wir in soviel Chloroform auf, daß eine 40-50%ige Lösung der Metylester der Fettsäuren resultierte. Der Perjodsäureabbau der Sphingosine wurde nach den Angaben von SWEeley⁴⁰⁾ mit einer 0.2 molaren wässrigen Natriummeterperjodatlösung durchgeführt. Die Rohaldehyde wurden durch Säulenchromatographie gereinigt. Die Aldehyde wurden entweder sofort gaschromatographiert oder in verdünnter Chloroformlösung bei -20°C kurze Zeit aufbewahrt.

b) Gaschromatographische Analyse

Gerät: Gasofract, Modell 300/B (Fa. Dr. Virus, Bonn), ausgerüstet mit thermostatisiertem Einspritzblock, automatischer Druckregelung, einer bis 300° stufenlos

einstellbaren, thermostatisierten Konstantheizung, einer durch einen Luftthermostaten temperierten Schnellheizung und einer Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle.

Säulendimensionen: Kupfersäule von 4 mm innerem Durchmesser und 240 mm Länge bei polarer und 120 mm Länge bei unpolarer Säulenfüllung.

Trägermaterialien: Kieselgur Merck für Gaschromatographie 0.2-0.3 mm oder Chromosorb W bzw. WS 42/60 mesh, Schuchardt.

Imprägnierungsphasen: Reoplex 400, Merck f. Gaschromatographie bzw. Liquid phase LAC-1R-296, Roth und Apiezon L f. Gaschromatographie, Schuchardt.

Imprägnierungsgrad: jeweils 20%; Entfernung der Restaktivitäten der Adsorbentien durch Zusatz von 0.3% Natriumcapronat.

Trägergas: käufliches Wasserstoffgas

Gasdruck und Strömungsgeschwindigkeit des Gases: je nach Trennproblem verschieden

Säulentemperatur: je nach Trennproblem verschieden

Einlaßtemperatur: etwa 50° höher als die gewählte Säulentemperatur

Konditionierung der Säulen: 12-stündiges Erhitzen auf die maximale Arbeitstemperatur von 200-220° bei 90-100 ml H₂/Minute Gasdurchfluß

Registrierung der Chromatogramme: mit automatischem Kompensator für mV- und Temperaturmessung Type PR 2210A/21 der Fa. Phillips

Empfindlichkeit: bei 200 mA als Brückenstrom der Meßzelle und 2.5 mV als Meßbereich des Kompensators = 10⁻⁶-10⁻⁷ g/ml.

Papiervorschub: 0.5 cm/Minute

Die Proben brachten wir in Chloroform gelöst mit einer Einmikroliterspritze auf die Säule auf. Die analysierten Mengen an Aldehyden und Fettsäuremethylestern betrugen 30-100µg pro Analyse.

Die Identifizierung der oxydativen Spaltprodukte der Sphingosine, der Aldehyde, Mono- und Dicarbonsäuren geschah durch Vergleich der Retentionszeiten der Aldehyde und Säuren mit denen der Testsubstanzen. Zur Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung der Sphingosinbasengemische wurden die Gaschromatogramme der nach dem Perjodsäureabbau entstandenen Aldehyde herangezogen. Aus einem Vergleich der durch Planimetrieren bestimmten Kurvenfläche der einzelnen Aldehyde mit der Gesamtkurvenfläche aller vorhandenen Aldehyde ergab sich die prozentuale Verteilung der Sphingosinbasen im Gemisch.

Herkunft der verwendeten Testsubstanzen

Laurinaldehyd puriss.	Fa.Fluka, A.G., Buchs SG/Schweiz
Stearinaldehyd puriss.	Fa. EGA-Chemie, Steinheim
Myristinaldehyd	durch Zersetzen ihrer Natriumhydrogenbisulfitverbindungen (Fa.Fluka, A.G., Buchs SG/Schweiz)
Palmitinaldehyd	durch Perjodsäureoxydation von C ₁₈ -Dihydrosphingosin
Pentadecanaldehyd	durch Perjodsäureoxydation von C ₁₈ -Phytosphingosin
Heptadecanaldehyd	durch Perjodsäureoxydation von C ₁₈ -Sphingin oder C ₂₀ -Phytosphingosin
Nonadecanaldehyd	durch Perjodsäureoxydation von C ₂₀ -Sphingin
Hexadecenal	durch Perjodsäureoxydation von C ₁₈ -Sphingosin
2-O-Methyl-3,4-trans-heptadecenal	durch Perjodsäureoxydation von 3-Methoxysphingosin
Malon-, Bernstein-, Glutar- und Adipinsäuredimethylester	Fa.Fluka, A.G., Buchs SG/Schweiz
Pentadecan- und Heptadecansäuremethylester	Fa.Fluka, A.G., Buchs SG/Schweiz
Capron-, Caprin-, Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure	Fa.E.Merck, A.G., Darmstadt

Die Freisetzung des Myristin- und Palmitinaldehyds aus ihren Natriumhydrogenbisulfitverbindungen erfolgte nach den Angaben von DEBUCH¹¹²⁾.

IV. Hydrierung der Sphingosinbasen im Mikromaßstab

10-40 mg Sphingosine lösten wir in 5 ml Dioxan reinst, Merck und hydrierten unter Zusatz von 10-20 mg Platinoxid in einer geschlossenen Apparatur (Typ MHYD der Fa.E.Eydam,Kiel) ohne Wasserstoffnachspeisung bei normalem Druck und einer Temperatur von 20-25°C. Die Hydrierung der Sphingosinbasen war innerhalb von 12-18 Stunden vollständig. Nach erfolgter Wasserstoffaufnahme filtrierten wir vom Platinoxidkatalysator ab und verwendeten die klare Lösung entweder zur Dünnschichtchromatographie oder nach schonendem Abengen des Dioxans den verbliebenen Rückstand zur gaschromatographischen Untersuchung.

V. Methoden zur quantitativen Bestimmung der Gesamtsphingosine

a) Die Bestimmung des Sphingosinstickstoffs führten wir nach der Vorschrift von McKIBBIN und TAYLOR³⁹⁾ in der Modifikation von CARTER³¹⁾ aus. Der Stickstoffgehalt der einzelnen Proben wurde mit einer modifizierten Mikro-Kjeldahlmethode bestimmt. Die Ergebnisse der verschiedenen Bestimmungen sind in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt.

T a b e l l e 25
Ergebnisse der Sphingosinstickstoffbestimmung

Verbindung	Einwaage mg	Verdünnung ml/ml	Verbrauch n/100 HCl	µg N	% N
Erdnußphyto- glykolipid	223.6	100/10	1.16	162.3	0.728
Candidacere- brine	203.4	100/10 100/5	2.67 1.31	374.0 183.5	1.84 1.81
C ₂₀ -Phyto- sphingosin	10.2	100/10	0.271	38.0	3.79 = 94% d.Th.
Candidacerebrin + C ₂₀ -Phyto- sphingosin	202.8 + 10.5	100/10	2.83	398.0	3.98 = 95% d.Th.

b) Die quantitative spektrophotometrische Bestimmung der Gesamtsphingosine

1. Spektrophotometrische Bestimmung der Sphingosine mit der Methylorangemethode

Zur Bestimmung der tierischen und pflanzlichen Sphingosine wurde die von LAUTER⁵⁹⁾ ausgearbeitete Methylorangemethode verwendet, die wir entsprechend unseren Erfordernissen modifizierten.

Zur Hydrolyse der Phytoglykolipide, Mykoglykolipide, Cerebrine und Cerebroside bewährte sich die 6-stündige Hydrolyse mit 2n methanolischer Salzsäure oder 5%iger methanolischer Schwefelsäure oder die 4-stündige Hydrolyse mit 4n methanolischer Salzsäure. Aus den durch Ausschütteln mit Petroläther von den Fettsäuren befreien und anschließend alkalisierten Hydrolysaten wurden die Sphingosinbasen mit Chloroform oder Diäthyläther extrahiert. Die extrahierten Basen wurden in einem genau abgemessenen Volumen Chloroform gelöst.

Ausführung der Bestimmungen

Reagentien: 1) Äthylacetat, redestilliert

2) 0.01 molarer Acetatpuffer, pH 3.65. Die auf einen pH von 3.65 eingestellte Pufferlösung wurde mit Äthylacetat gewaschen.

3) Methylorangelösung: 500 mg Natriumsalz der p,p'-Dimethylaminoazobenzolsulfonsäure, Bayer wurde in 100 ml warmen Wassers gelöst, die Lösung filtriert und 3-4mal mit Chloroform ausgeschüttelt.

Zur Bestimmung der Sphingosinbasen wurde ein aliquoter Teil der Analysenlösung (=etwa 40-90 µg Sphingosinbasen) zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 5 ml Äthylacetat aufgenommen. Nach Zufügen von 2 ml 0.01 molaren Acetatpuffers und 0.1 ml Methylorangereagens schüttelten wir das Gemisch 1 Minute lang kräftig durch und zentrifugierten anschließend. Der Methylorange-Sphingosinkomplex in der überstehenden Äthylacetatphase wurde gegen eine entsprechende Blindlösung, die

aus 5 ml Äthylacetat, 2 ml 0.01 molarem Acetatpuffer und 0.1 ml Methylorangereagens bestand und analog wie die Analysenlösung behandelt worden war, ausgemessen. Messung im Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q bei 415 m μ (Schichtdicke der verwendeten Glasküvette d = 1 cm). Die Extinktionswerte der einzelnen Proben wurden bestimmt und unter Zuhilfenahme von Eichkurven, die mit authentischem C₁₈-Sphingosin, C₁₈-Dihydrosphingosin und C₂₀-Phytosphingosin angelegt worden waren, der Gehalt an langkettigen Basen ermittelt. Bei Verwendung der C₁₈-Sphingosineichkurve zur Bestimmung der Dihydrosphingosine und Phytogsphingosine mußten die ermittelten Werte zur Errechnung des wahren Sphingosingehaltes mit entsprechenden Umrechnungsfaktoren multipliziert werden.

<u>Umrechnungsfaktoren:</u> für C ₂₀ -Phytosphingosin	3.905
Anhydrophytosphingosin	2.968
C ₁₈ -Dihydrosphingosin	1.25
C ₁₈ -Sphingin	0.75

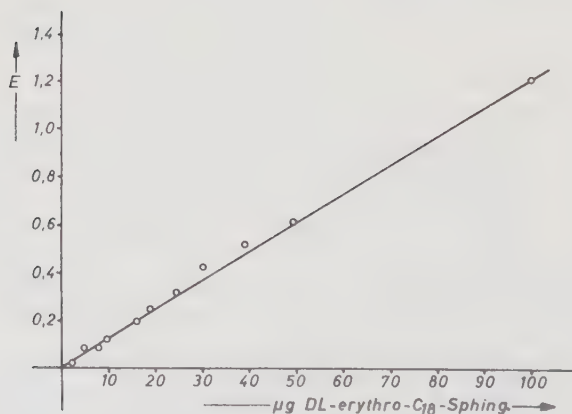


Abb. 33

Quantitative Bestimmung der Sphingosine mit der Methylorangemethode
C₁₈-Sphingosin-Eichkurve

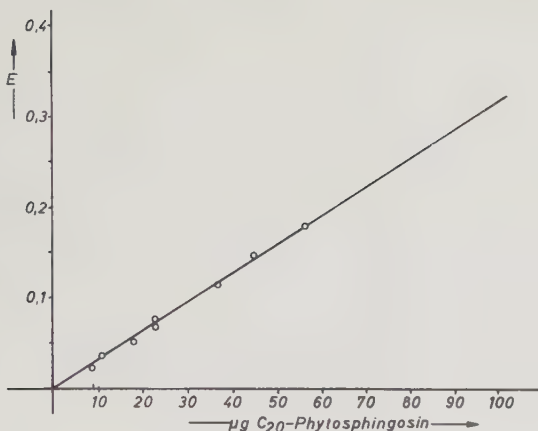


Abb. 34

Quantitative Bestimmung der Sphingosine mit der Methylenorangermethode
C₂₀-Phytosphingosin-Eichkurve

2. Spektrophotometrische Bestimmung der Sphingosine mit einer modifizierten Dinitrofluorbenzolmethode

Die Hydrolyse der Sphingolipide nahmen wir wie unter 1. beschrieben vor.

Ausführung der Bestimmungen

Reagentien: 1) 6 n wässrige Salzsäure

2) Boratpuffer, pH 10

3) Fluordinitrobenzolreagens (50 millimolar): 1 Volumen Fluordinitrobenzol p.a., Merck lösten wir in 160 ml absoluten Äthanol

4) Propionsäure, Merck

Zur Bestimmung der Sphingosine wurde ein aliquoter Teil der Analysenlösung, der ungefähr 15-180 µg langkettige Basen enthielt, zur Trockene eingedunstet und der Rückstand in 1 ml Boratpuffer suspendiert. Wir gaben 0.1 ml Fluordinitrobenzolreagens zu und erhitzen den Ansatz unter Rückflußkühlung 30 Minuten lang bei 60° (56-63°). Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, setzten

wir 0.5 ml 6 n Salzsäure und 1.75 ml Propionsäure zu. Der Reaktionsansatz wurde im Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q gegen eine entsprechende Blindlösung ausgemessen. Die Blindlösung enthielt 1 ml Boratpuffer, 0.1 ml Fluordinitrobenzolreagens, 0.5 ml 6n HCl und 1.75 ml Propionsäure und wurde in gleicher Weise wie der Reaktionsansatz behandelt. Messung von Sphingosin und Dihydrosphingosin mit einer Glasküvette von 1 cm Schichtdicke, von Phytosphingosin mit einer Glasküvette von 2 cm Schichtdicke. Der Gehalt an Sphingosinbasen wurde nach Ermittlung der Extinktion unter Zuhilfenahme einer Eichkurve bestimmt, die mit authentischen Sphingosinen angelegt worden war.

Umrechnungsfaktor: für C₂₀-Phytosphingosin 1.338

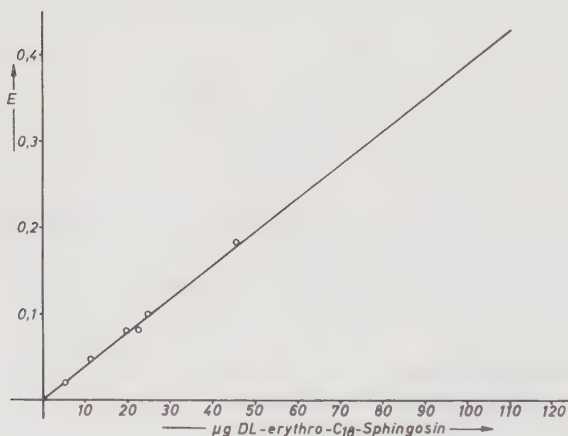


Abb. 35

Quantitative Bestimmung der Sphingosine mit der Dinitrofluorbenzol-methode

C₁₈-Sphingosin-Eichkurve

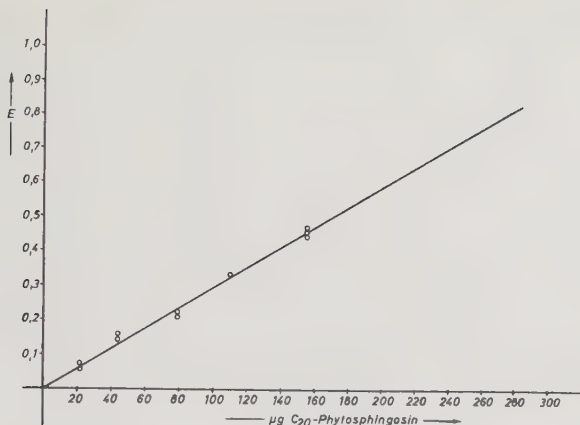


Abb. 36

Quantitative Bestimmung der Sphingosine mit der Dinitrofluorbenzol-
methode

C₂₀-Phytosphingosin-Eichkurve

3. Spektrophotometrische Bestimmung der Sphingosine mit einer modifizierten Ninhydrinmethode

Die Hydrolyse der Sphingolipide nahmen wir wie unter 1. beschrieben vor.

- a) Reagentien:
- 1) 2-Äthoxyäthanol p.a. Merck
 - 2) 0.2 molarer Citratpuffer, pH 5.0. Dinatriumhydrogenphosphat/citronensäurepuffer
 - 3) Ninhydrinreagens: 5%ige Lösung in 2-Äthoxyäthanol p.a. Merck
 - 4) Kaliumcyanidlösung: 1.5 ml einer 0.01 molaren Kaliumcyanidlösung wurden mit 2-Äthanol p.a. Merck auf 50 ml verdünnt.
 - 5) 80%iges wässriges Äthanol

b) Bestimmung von Sphingosin und Dihydrosphingosin:

Ein aliquoter Teil der Analysenlösung, der 15-150 μg langkettige Basen enthielt, wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand in 1 ml 2-Äthoxyäthanol aufgenommen. Wir gaben 0.5 ml Citratpuffer, 0.2 ml Ninhydrinreagens und 1 ml Kaliumcyanidlösung zu, verschlossen die Reaktionsgefäße fest mit Glasstopfen und erhitzen 30 Minuten lang im kochenden Wasserbad. Die unter fließendem Wasser abgekühlten Reaktionsansätze versetzten wir mit 2 ml 80%igem wässrigem Äthanol und bestimmten die Extinktion der Analysenproben und der Blindproben in einer 1 cm Glasküvette im Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q bei einer Wellenlänge von 570 $\text{m}\mu$. Der Gehalt der Sphingosinbasen wurde unter Zuhilfenahme der mit authentischen Sphingosinen angelegten Eichkurven bestimmt.

Umrechnungsfaktor: für C_{20} -Phytosphingosine: 33.71

c) Bestimmung der Phytosphingosine:

Die Bestimmung, zu der ein 40-400 μg Phytosphingosine enthaltender aliquoter Teil der Analysenlösung verwendet wurde, führten wir wie vorstehend angegeben aus. Statt 2 ml 80%iges Äthanol wurden nur 1 ml zugegeben und die Extinktion in einer 2 cm-Glasküvette ausgemessen. Bei Halbierung der Reaktionsansätze und Zuzufügen von nur 0.5 ml Äthanol kann auch eine 1 cm-Glasküvette verwendet werden. Mit authentischem C_{20} -Phytosphingosin wurde eine Eichkurve angelegt.

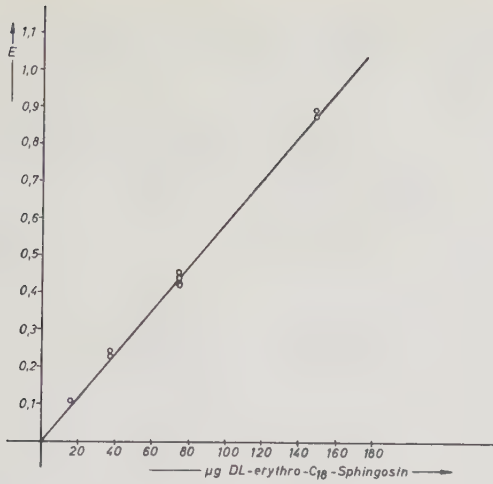


Abb. 37

Quantitative Bestimmung der Sphingosine mit der Ninhydrinmethode
C₁₈-Sphingosin-Eichkurve

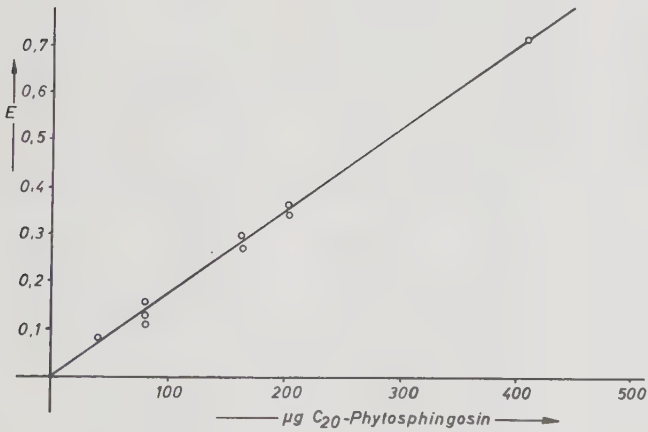


Abb. 38

Quantitative Bestimmung der Sphingosine mit der Ninhydrinmethode
C₂₀-Phytosphingosin-Eichkurve

T a b e l l e 26

Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Sphingosine des Erd-
nußphytoglykolipids

Einwaage mg	Hydrolysen- methode	gem. Ex- tinktion	Verdünnung ml/ml	Sphingosine gefunden µg	Sphingosine gefunden %	Me- thode
18.15	Ba(OH) ₂ ges.	0.134	1/100	45.0	23.52	Me- thyl- oran- ge-
18.15	+ HCl conc.	0.125	1/100	40.8	21.16	
20.90	2n meOH-HCl	0.635	1/20	210.0	20.10	
20.90		0.115	1/100	37.0	17.60	
23.65		0.151	1/100	49.0	20.70	
23.60	5% meOH-	0.778	1/20	255.0	21.60	Dini- tro- fluor- ben- zol-
23.60	H ₂ SO ₄	0.17	1/100	54.5	23.02	
23.60		0.152	1/100	49.0	20.80	
23.60		0.147	1/100	48.0	20.30	
18.15	Ba(OH) ₂ ges.	0.132	1/100	46.0	24.70	
18.15	+ HCl conc.	0.113	1/100	40.0	21.40	Nin- hy- drin-
23.65	2n meOH-HCl	0.183	1/100	64.0	26.60	
23.60	5% meOH-	0.184	1/100	64.0	26.70	
23.60	H ₂ SO ₄	0.178	1/100	62.0	25.40	
18.15	Ba(OH) ₂ ges.	0.152	1/50	88.0	22.05	
18.15	+ HCl	0.144	1/50	82.0	20.90	
18.15		0.186	1/50	105.0	22.60	
23.65	2n meOH-HCl	0.178	1/50	100.0	17.80	
23.65		0.189	1/50	106.0	21.10	
23.60	5% meOH-	0.203	1/50	116.0	24.15	
23.60	H ₂ SO ₄	0.194	1/50	110.0	21.60	

T a b e l l e 27

Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Sphingosine der Candida-
cerebrine-, mykoglykolipide-, cerebrosid und des Saccharomycesmyko-
glykolipids

Sphingo- lipide	Einwaage mg	Hydrolysen- methode	gem.Ex- tink- tion	Verdün- nung ml/ml	Sphin- gosine gefun- den µg	Sphin- gosine gefun- den %	Methode
Candida- cerebrin							
I	19.60	2n meOH-HCl	0.297	1/100	93.0	47.5	Methyl- orange-
	21.15	5%meOH-H ₂ SO ₄	0.317	1/100	99.0	48.5	
II	10.95	2n meOH-HCl	0.161	1/50	52.0	47.7	
aus Can- didahefe	6.80	2n meOH-HCl	0.192	1/50	62.0	45.02	
isol.	7.10	5%meOH-H ₂ SO ₄	0.20	1/50	64.0	45.70	
II	10.95	2n meOH-HCl	0.122	1/100	41.0	43.5	Dinitro- fluorben- zol-
	10.95			1/100		44.8	
	10.95		0.124	1/100	48.0	47.0	
II	10.95	2n meOH-HCl	0.185	1/50	106.0	49.0	Ninhydrin
	10.95		0.165	1/50	47.2	47.2	
	10.95		0.160	1/50	46.0	46.0	
Candidamy- koglykoli- pid	6.35	5%meOH-H ₂ SO ₄	0.256	1/25	80.5	31.8	Methyl- orange-
	6.35		0.265	1/25	83.25	32.42	
Saccharomy- cesmykogly- kolipid	7.28	5%meOH-H ₂ SO ₄	0.295	1/25	92.0	31.6	
	7.28		0.296	1/25	93.0	31.9	
Candidace- rebrosid	1.785	5%meOH-H ₂ SO ₄	0.633	1/10	64.8	36.55	
	1.785		0.653	1/10	67.25	37.65	
	1.785		0.643	1/10	66.00	37.05	

Modellversuche

Spingo- lipid	Spingolipid Einwaage mg	Spingosin Einwaage mg	Hydrolysen- methode	gem.Ex- tinktion	Verdünnung ml/ml	Spingosine gefunden µg	Spingosine gefunden mg od. %	Spingosine berechnet mg od. %	%	Methode
Candida- cerebrin	19.60		2n meOH-HCl	0.297	1/100	93.0	47.5 %	46.5 %	102.1	Methylorange-
	6.80			0.192	1/50	62.0	45.02 %	46.5 %	97.4	
	10.95		5%meOH-H ₂ SO ₄	0.162	1/50	52.0	47.7 %	46.5 %	102.5	
	21.15			0.316	1/100	99.0	48.5 %	46.5 %	104.3	
	7.10			0.20	1/50	64.0	45.7 %	46.5 %	98.4	Dinitrofluor- benzol-
	15.90	4.15	2n meOH-HCl	0.375	1/100	60.5	11.60 mg	11.55 mg	100.4	
	15.85	6.25	5%meOH-H ₂ SO ₄	0.411	1/100	65.0	13.20 mg	13.63 mg	97.0	
	10.95		2n meOH-HCl	0.122	1/100	41.0	43.5 %	46.5 %	93.5	
	10.95			0.123	1/100	45.8	44.8 %	46.5 %	97.0	Ninhydrin-
	10.95			0.124	1/100	48.0	47.0 %	46.5 %	101.0	
	10.90	3.45		0.245	1/100	84.0	8.4 mg	8.52 mg	98.25	
	10.90	3.45		0.255	1/100	84.5	8.45 mg	8.52 mg	99.0	
	10.95		2n meOH-HCl	0.185	1/50	106.0	49.0 %	46.5 %	105.5	Methylorange-
	10.95			0.165	1/50	94.0	47.2 %	46.5 %	101.5	
	10.95			0.160	1/50	90.0	46.0 %	46.5 %	99.0	
	10.90	3.45		0.317	1/50	176.0	8.55 mg	8.52 mg	100.45	
Bänderhirn- cerebroside	10.90	3.45		0.340	1/50	193.0	8.85 mg	8.58 mg	103.7	Methylorange-
	9.50	3.45	4n meOH-HCl	0.98	1/50	76.0	39.55 %	39.55 %	103.7	
	9.50			0.99	1/50	76.8	39.60 %	39.60 %	103.7	
	9.50			0.985	1/50	76.5	39.57 %	39.60 %	103.7	
	5.50		2n meOH-HCl	0.295	1/100	22.8	39.60 %	39.60 %	103.7	Dinitrofluor- benzol-
	5.50			0.289	1/100	22.4	39.58 %	39.58 %	103.7	
	5.50			0.281	1/100	21.8	39.51 %	39.51 %	103.7	
	8.25	1.45	4n meOH-HCl	1.238	1/50	96.0	4.80 mg	4.71 mg	102.0	
	8.25	1.45		1.23	1/50	95.6	4.78 mg	4.71 mg	102.0	Ninhydrin-
	8.25	1.45	4n meOH-HCl	1.242	1/50	96.4	4.82 mg	4.71 mg	102.0	
	9.50		4n meOH-HCl	0.306	1/50	79.25	39.62 %	39.62 %	103.0	
	9.50			0.309	1/50	79.62	39.51 %	39.51 %	98.0	
	8.25	1.45	4n meOH-HCl	0.191	1/100	48.5	4.85 mg	4.85 mg	103.0	Methylorange-
	8.25	1.45		0.178	1/100	46.0	4.80 mg	4.71 mg	98.0	
	9.50		4n meOH-HCl	0.22	1/100	37.0	38.0 %	4.71 mg	103.0	
	9.50			0.225	1/100	39.0	41.05 %	4.71 mg	98.8	
	8.25	1.45		0.276	1/100	46.5	4.65 mg	4.71 mg	91.5	
	8.25	1.45		0.251	1/100	43.0	4.30 mg	4.71 mg	91.5	

II. Die Untersuchung der Sphingosine der isolierten Sphingolipide

1. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine aus Rinderhirnsphingolipiden

Aus frischem, durch Extrahieren mit Aceton und Äther von Fetten und der Hauptmenge an Esterphosphatiden befreitem Rinderhirn wurden mit Methanol hauptsächlich die Sphingolipide extrahiert, die von einem geringen Anteil Esterphosphatide begleitet waren. Letztere wurden nach den Angaben von SCHMIDT⁷³⁾ mit Kalilauge zerstört. Aus dem alkalischen Hydrolysat gewannen wir eine Gesamtsphingolipidfraktion des Rinderhirns. Aus den Gesamtsphingolipiden isolierten wir in Anlehnung an eine Methode von BOGOCH¹¹³⁾ die Ganglioside. Proben unveresterter Cerebroside, Sulfatide und Sphingomyeline des Rinderhirns, die am hiesigen Institut durch Craigverteilung gewonnen worden waren, standen uns zur Gewinnung ihrer Sphingosine, die als Vergleichssubstanzen für dünn-schicht- und gaschromatographische Sphingosinanalysen dienten, zur Verfügung.

a) Sphingosingemisch aus Gesamtsphingolipiden des Rinderhirns

25 g Gesamtsphingolipide des Rinderhirns hydrolysierten wir mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure und isolierten aus dem Hydrolysat nach den Angaben von CARTER¹⁷⁾

5 g Rohsphingosinbasen. Diese überführten wir nach einer Vorschrift von CARTER¹⁷⁾³¹⁾ in ihre Sulfate, die wir durch wiederholte Umkristallisation aus Methanol reinigten. Durch Zersetzung der Sphingosinsulfate mit Natriumhydroxyd erhielten wir ein Gemisch aus freiem Sphingosin und Dihydrosphingosin. Aus 5 g Rohsphingosinbasengemisch gewannen wir 1.09 g reine Sphingosine und Dihydrosphingosine in Form einer weißen kristallinen Substanz.

Schmp.-Sphingosinsulfate: 235° unter Zersetzung (nach Thiele, uncorr.)

Schmp.-freie Sphingosine: 75-80° (nach Thiele, uncorr.)

Wie die gaschromatographische Analyse ergab, setzten sich die Sphingosine der Gesamtsphingolipide aus C₁₆- und C₁₈-Dihydrosphingosinen und C₁₈- und C₂₀-Sphingosinen zusammen.

b) Sphingosingemische aus Cerebrosiden und Sphingomyelinen des Rinderhirns

Ein Cerebrosidgemisch und ein Sphingomyelingemisch aus Rinderhirn wurde nach der Methode von SWEELEY und MOSCATELLI⁴⁰⁾ mit Salzsäure hydrolysiert. Reinigung der isolierten Sphingosine durch Säulenchromatographie⁴⁰⁾.

Die Sphingosine der unveresterten Cerebroside und der Sulfatide des Rinderhirns bestanden aus C₁₆- und C₁₈-Dihydrosphingosinen und C₁₈-Sphingosin, die der Sphingomyeline aus C₁₆- und C₁₈-Dihydrosphingosinen, C₁₈-Sphingosin und einer geringen Menge C₂₀-Sphingosin (Ergebnis der gaschromatographischen Analyse).

c) Sphingosingemisch aus Gangliosiden

Die Hydrolyse der Ganglioside nahmen wir nach einer Methode von KLENK und PADBERG¹¹⁴⁾ mit 10%iger wässriger Salzsäure vor. Die mit einem Gemisch aus Petroläther/Äther aus dem Hydrolysat extrahierten Sphingosine wurden durch Säulenchromatographie nach SWEELEY⁴⁰⁾ gereinigt. Ausbeute an Lohsphingosinbasen aus 93.35 mg Gangliosiden: 18.6 mg. Das Sphingosingemisch der Ganglioside bestand aus C₁₆- und C₁₈-Dihydrosphingosin und C₁₈- und C₂₀-Sphingosin. Letztere Sphingosine waren die Hauptkomponenten des Sphingosingemisches (Ergebnis der gaschromatographischen Analyse).

d) O-Methylsphingosine¹¹⁵⁾

Die nach Umkristallisation des Sphingosinbasengemisches der Gesamtsphingolipide bzw. Cerebroside und Sphingomyeline verbliebenen alkoholischen Mutterlagen wurden im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand unter Erwärmen in einem 10-fachen Volumen Methanol aufgenommen. Den nach 12-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur gebildeten Niederschlag filtrierten wir ab. Der Rückstand des Filtrates wurde nochmals in Methanol aufgenommen und der nach 12 Stunden gebildete Niederschlag wiederum verworfen. Die überstehende Lösung, die die O-Methylsphingosinsulfate enthielt, brachten wir zur Trockene, versetzten den Rückstand mit einem Überschuß an 1n wässriger Kalilauge und extrahierten die freigesetzten Basen mit Äther. Aus der mit Wasser sorgfältig gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockne-

ten Ätherphase erhielten wir eine wachsartige Substanz, die aus wenig Methanol umkristallisiert wurde.

Ausbeute an O-Methyläther der Sphingosine: 35 mg

Schmp.: 129-132° (nach Thiele, uncorr.)

e) threo-Sphingosine

10 mg Basengemisch aus Rinderhirnsphingolipiden wurde mit einem 10-fachen Volumen 5%iger methanolischer Schwefelsäure rückflußgekocht. Die Basen wurden nach dem Alkalisieren der sauren Lösung durch Extrahieren mit Äther isoliert. Im Dünnschichtchromatogramm konnte eine Anreicherung der threo-Komponente im Sphingosinbasengemisch festgestellt werden.

2. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine aus den

Cerebrinen der Candida utilis-Hefe

Die Isolierung der Hefecerebrine aus einem "technischen Torulacerebrin" und aus Candida utilis-Hefe erfolgte in der auf S. 164 beschriebenen Weise.

Zur Untersuchung gelangten aus "technischem Torulacerebrin" gewonnene Hefecerebrine vom Schmelzpunkt 135-136.5° (Cerebrin I), vom Schmelzpunkt 135-137.7° (Cerebrin II) und vom Schmelzpunkt 144-145° (Cerebrin IV) und ein aus Candida utilis-Hefe isoliertes Cerebrin vom Schmelzpunkt 139-140° (Cerebrin V).

a) Isolierung der Sphingosine aus Hefecerebrin

1.5 g Hefecerebrin (IV), dargestellt aus "technischem Torulacerebrin" nach der auf Seite 165 beschriebenen Methode wurden mit gesättigter Bariumhydroxydlösung hydrolysiert³⁸⁾.

Ausbeute an Rohbase: 524 mg.

Zur Reinigung wurden 500 mg Rohbase in 25 ml kochendem Aceton gelöst. Aus der auf 4° abgekühlten Lösung erhielten wir 300 mg Kristallisat, das noch mehrmals aus Aceton umkristallisiert wurde.

Ausbeute an reinem Acetonderivat: 180 mg

Schmp.: 107.5-110°C.

Durch Spaltung des Acetonderivates mit Mineralsäure gewannen wir die reinen Sphingosinbasen zurück.

Eine zweite Menge Sphingosine gewannen wir durch Hydrolyse von 339.7 mg Hefecerebrine (IV) mit einem 100-fachen Überschuß an 2 n methanolischer Salzsäure. Aus 339.7 mg Hefecerebrine erhielten wir 187.45 mg Rohbasen. 107.3 mg dieser Rohbasen wurden nach der Methode von SWEeley⁴⁰⁾ gereinigt und ergaben 97.7 mg Reinbasen. 50 mg der aus Hefecerebrin gewonnenen Sphingosinbasen wurden in bekannter Weise in das Acetonderivat übergeführt.

Ausbeute: 21 mg

Schmp.: 106-108° (nach Kofler, uncorr.)

C ₁₈ -Base (357.5)	ber. C 70.53 %	H 12.12 %	N 3.92 %
C ₂₀ -Base (385.5)	ber. C 71.64 %	H 12.27 %	N 3.63 %
	gef. C 70.24 %	H 12.03 %	N 4.10 %

b) Dünnschichtchromatographie der Hefecerebrinsphingosine

Die isolierten Sphingosine wurden nach säulenchromatographischer Reinigung auf Kieselgel-G-Schichten im Laufmittelsystem CHCl₃-MeOH-H₂O (65:25:4) aufgetrennt.

T a b e l l e 29

Dünnschichtchromatographie der Candidacerebrinsphingosine

Cerebrin	Hydrolyse	C ₁₈ ⁻ , C ₂₀ ⁻ Phytosphingosin R _f = 0.27 I	C ₁₈ ⁻ , C ₁₆ ⁻ Dihydro-sphingosin R _f = 0.37 II	R _f = 0.40 III	Anhydro-phyto-sphingosine R _f = 0.55 IV
Cerebrin I	Ba(OH) ₂	+	+	(+)	
Cerebrin IV	H ₂ SO ₄	+	(+)		+
Cerebrin V	HCl	+	+		+

Zwei weitere, durch Umkristallisieren und Extraktion von Cerebrin I mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln erhaltene Cerebrine (Darstellung siehe Versuchsteil S.165), die einen Schmelzpunkt von 135.4-137.7° (Cerebrin II) und 140-144.5° (Cerebrin III) besaßen, ergaben ein mit den bereits besprochenen Cerebrinen übereinstimmendes chromatographisches Bild ihrer Sphingosinbasen.

c) Gaschromatographie der Candidacerebrinsphingosine

Die Sphingosine wurden mittels Perjodsäure und Chromsäure oxydiert und die dabei entstandenen Aldehyde und Säuren wie auf Seite 93 beschrieben identifiziert.

T a b e l l e 30

Gaschromatographische Analyse der Sphingosine der Candidacerebrine

Versuchsbedingungen	Oxydationsprodukte	Retent.-Zeit Minuten/Sek.	Zuordnung Sphingosine
Säule: 120 mm x 4 mm	Tetradecansäure	4'00''	C ₁₆ -Dihydro-
Füllung: 20% Apiezon	Pentadecansäure	6'12''	C ₁₈ -Phyto-
L auf Chromosorb	Hexadecansäure	9'40''	C ₁₈ -Dihydro-
W 0.2-0.3 mm	Heptadecansäure	15'12''	C ₂₀ -Phyto-
Träger-Gas: 0.5 kg/ cm ² ; 140-160 ml H ₂ /Min.			
Temp.: 200°			
Säule: 240 mm x 4 mm	Tetradecanal	4'36''	C ₁₆ -Dihydro-
Füllung: 20% LAC-1R-	Pentadecanal	6'36''	C ₁₈ -Phyto-
296 auf Kieselgur	Hexadecanal	9'00''	C ₁₈ -Dihydro-
0.2-0.3 mm	Heptadecanal	12'24''	C ₂₀ -Phyto-
Träger-Gas: 1.34 kg/ cm ² ; 110 ml H ₂ /Min.			
Temp.: 190°			

d) Isolierung und Charakterisierung der Anhydrophytosphingosinbase

Die Anhydrocerebrinbase wurde durch hydrolytische Spaltung eines reinen Anhydrocerebrins (Schmp.: 120-121°) gewonnen. Reines Anhydrocerebrin stellten wir wie auf Seite 168 beschrieben aus gereinigtem "technischen Torulacerebrin" her. Die Hydrolyse nahmen wir nach CARTER³¹⁾ mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure oder nach TURULLA¹¹⁶⁾ mit 10%iger propylalkoholischer Schwefelsäure vor. Im Hydrolysenansatz nach TURULLA erhielten wir aus 1.4 g Anhydrocerebrin 0.48 g Anhydrocerebrinbase, die bei Raumtemperatur in Diäthyläther, Petroläther und Hexan mäßig, in Äthanol, Methanol, Eisessig, Benzol und Aceton oder in einem Gemisch aus Äthanol und Hexan gut löslich war.

Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Hexan-Äthanol (1:1) besaß die Anhydrobase einen S c h m e l z p u n k t von 95-97° (nach Kofler, unkorrt.).

Trocknung der Substanz i.H.V. bei 90°C.

$C_{18}H_{37}O_2N$	(299.5)	ber. C	72.19%	H	12.45%	N	4.68%
$C_{20}H_{41}O_2N$	(327.5)	ber. C	73.33%	H	12.62%	N	4.28%
		gef. C	72.88%	H	12.56%	N	4.32%

$\alpha_{20}^D = 33.5^\circ$ ($c = 2.3$ in Chloroform; $d = 2$ dm)

3. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine der Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide

Die Mykoglykolipide wurden wie auf Seite 151 beschrieben aus *Candida utilis* und *Saccharomyces cerevisiae* isoliert.

127 mg Candidamykoglykolipid bzw. 102.35 mg Saccharomycesmykoglykolipid hydrolysierten wir mit der 40-fachen Menge 5%-iger methanolischer Schwefelsäure durch 6-stündiges Rückflußkochen nach der Methode von CARTER³¹⁾. Die Rohbasen reinigten wir nach der Methode von SWEETLEY⁴⁰⁾.

Ausbeute: 27.8 mg Sphingosingemisch aus Candidamykoglykolipid

22.3 mg Sphingosingemisch aus Saccharomycesmykoglykolipid

a) Dünnschichtchromatographie der Hefemykoglykolipidsphingosine
Kieselgel-G, Merck; $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (65:25:4) (Abb. 14, S. 38)

T a b e l l e 31

Dünnschichtchromatographie der Hefemykoglykolipidsphingosine

Mykoglyko- lipide	C_{18} -, C_{20} -Phy- tosphingosine	C_{18} -Dihydro- sphingosin	Anhydro- phyto- sphingosin- base		
	$R_f = 0.27$	$R_f = 0.37$	$R_f = 0.40$	$R_f = 0.55$	$R_f = 0.72$
	I	II	III	IV	V
Candida-	+	+	+	+	+
Saccharo- myces	+	+	-	+	+

T a b e l l e 32

Gaschromatographische Analyse der Sphingosine der Hefemykoglykolipide

Versuchsbedingungen	Oxydations- produkte	Retent.-Zeit Min./Sek.	Zuordnung Sphingosine
<u>Candidahefe:</u>			
Säule: 240 mm x 4 mm	Pentadecanal	2'43''	C ₁₈ -Phyto-
Füllung: 20% Reoplex 400 auf Chromosorb WS, 0.2-0.3 mm	Hexadecanal	3'42''	C ₁₈ -Dihydro-
	Heptadecanal	5'12''	C ₂₀ -Phyto-
Träger-Gas: 0.9 kg/cm ² ; 120 ml H ₂ /Min. Temp.: 210°			
<u>Saccharomyceshefe:</u>			
Säule: 240 mm x 4 mm	Pentadecanal	2'36''	C ₁₈ -Phyto-
Füllung: 20% Reoplex 400 auf Chromosorb WS, 0.2-0.3 mm	Hexadecanal	3'42''	C ₁₈ -Dihydro-
	Heptadecanal	5'06''	C ₂₀ -Phyto-
Träger-Gas: 0.9 kg/cm ² ; 120 ml H ₂ /Min. Temp.: 210°			

4. Isolierung und Identifizierung der Sphingosine des Candidacerebrosids

Das Cerebrosid wurde wie auf Seite 169 beschrieben aus *Candida utilis* isoliert.

1 Teil Cerebrosid (4.01 mg) hydrolysierten wir mit der 40-fachen Menge 5%-iger methanolischer Schwefelsäure oder (24.8 mg) mit einem 100-fachen Überschuß an 2n methanolischer Salzsäure. Die Sphingosinbasen wurden mit Hilfe der Methode von SWEeley⁴⁰⁾ gereinigt.

a) Dünnschichtchromatographie des Sphingosingemisches aus Candidacerebrosid

Kieselgel-G, Merck; CHCl₃-MeOH-H₂O (65:25:4). (Abb.17, S.41)

T a b e l l e 33

Dünnschichtchromatographie der Sphingosine des Candidacerebrosids

Cerebrosid aus	Hydrolysen-methode	R _F -Werte gefundene Substanzen	R _F -Werte Testsubstanzen- Sphingosin
Candida ut.	H ₂ SO ₄	I. 0.35-0.38	0.37-0.39 C ₁₈ -Dihydro-
		II. 0.39-0.43	0.41-0.42 threo-Sphingo-
		III. 0.49-0.55	0.44-0.45 erythro-Sphin-
Candida ut.	HCl	I. 0.35-0.39	0.52-0.53 0-Methyl-
		II. 0.45-0.49	0.39 C ₁₈ -Sphingin
		III. 0.52-0.56	0.40 C ₂₀ -Sphingin

4.5 mg der durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule gereinigten Sphingosinbasen wurden in 5 ml Tetrahydrofuran unter Zusatz von 10 mg Platinoxid bei normalem Druck und 20-25° hydriert. R_F-Wert der hydrierten Candidacerebrosidsphingosine: 0.38-0.41 (Abb.17, S.41).

b) Gaschromatographie der Sphingosine des Candidacerebrosids

Die Sphingosine des Candidacerebrosids wurden mit Chromsäure oxydiert und die Abbauprodukte wie auf Seite 93 beschrieben gaschromatographisch analysiert.

T a b e l l e 34

Gaschromatographische Analyse der Sphingosine des Candidacerebrosids

Versuchsbedingungen	Oxydations- produkte	Retent.-Zeit Min./Sek.	Zuordnung Sphingosine
Säule: 120 mm x 4 mm	Glutarsäure	0'18''	-
Füllung: 20% Apiezon	Adipinsäure	0'36''	C ₂₀ -Dehydro-
L auf Chromosorb WS		1'06''	-
0.2-0.3 mm	Laurinsäure	1'48''	C ₂₀ -Dehydro-
Träger-Gas: 0.5 kg/ cm ² ; 140-150 ml H ₂	Myristinsäure	3'00''	- C ₁₄ -Dihydro-
Temp.: 200°		4'52''	C ₁₆ -Dihydro-
			C ₁₈ -Sphingosin
	Palmitinsäure	12'12''	C ₁₈ -Dihydro-
			C ₂₀ -Sphingosin
	Heptadecansäure	19'00''	C ₁₈ -Sphingin

T a b e l l e 35

Retentionszeiten der Testsubstanzen (Mono- und Dicarbonsäuren)

Fettsäuren	Retent.-Zeit Min./Sek.	Fettsäuren	Retent.-Zeit Min./Sek.
Glutarsäure	0'18''	Pentadecansäure	7'52''
Adipinsäure	0'30''	Palmitinsäure	12'18''
Caprinsäure	0'48''	Heptadecansäure	19'00''
Laurinsäure	2'06''	Stearinsäure	29'12''
Myristinsäure	4'52''		

5. Isolierung und Identifizierung der Erdnußphytoglykolipid-sphingosine

Verschiedene Proben des Erdnußphytoglykolipids (IV) hydrolysierten wir mit gesättigter Bariumhydroxydlösung³⁸⁾, mit Bariumhydroxyd und Salzsäure³⁹⁾, mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure³¹⁾ und mit 2n methanolischer Salzsäure⁴⁰⁾. Die aus den sauren oder alkalischen Hydrolysaten mit Äther oder Chloroform extrahierten Sphingosinbasen reinigten wir durch Umkristallisieren aus Äther oder Methanol, über ihre Sulfat³¹⁾ und Acetonderivate oder durch Säulenchromatographie⁴⁰⁾.

Die Sphingosine des Erdnußphytoglykolipids, die von wachsartiger Konsistenz waren, lösten sich sehr gut in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und Methylenchlorid. Sie lösten sich gut in Äther, Petroläther, Hexan, Methanol, Äthanol, Pyridin, Benzol, Eisessig und Tetrahydrofuran. Sie waren unlöslich in Wasser.

Eine Probe des durch saure Hydrolyse aus dem Phytoglykolipid erhaltenen Rohsphingosins wurde wie auf Seite 86 beschrieben, in das Sulfat umgewandelt, aus dem nach mehrmaliger Umkristallisation aus Methanol die Phytosphingosinbasen abgespalten wurden. Das Phytosphingosingemisch kristallisierten wir noch mehrmals aus Hexan um. Die R₀substanz wurde im Vakuumexsiccator über S₀chwefelsäure konstant getrocknet.

Schmp.: 91-94° (nach Kofler, uncorr.)

91-93° (nach Thiele, uncorr.)

$C_{18}H_{37}NO_3$ (315.3)	ber.	C 68.36%	H 11.79%	N 4.43%
$C_{18}H_{39}NO_3$ (317.5)	ber.	C 68.07%	H 12.39%	N 4.42%
	gef.	C 67.49%	H 12.01%	N 4.75%

Acetonderivat der Erdnußphytoglykolipidsphingosine

Aus 208 mg Sphingosinen wurde nach den Angaben von CARTER³¹⁾ das Acetonderivat der Sphingosine dargestellt. Die Substanz wurde dabei in einem größeren Überschuß kochenden Acetons gelöst und der nach 12-stündigem Stehen bei 3-5° erhaltene kristalline Niederschlag noch mehrmals aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 116 mg einer in langen büschelförmig angeordneten Kristallnadeln kristallisierenden Substanz.

Schmp.: 114-115° (nach Kofler, unkorrr.)

Trocknung der Substanz i.H.V. bei 75°.

$C_{21}H_{43}NO_3$ (357.5)	ber.	C 70.53%	H 12.12%	N 3.92%
$C_{21}H_{41}NO_3$ (355.5)	ber.	C 70.99%	H 11.63%	N 3.94%
	gef.	C 70.72%	H 11.71%	N 4.16%
	gef.	C 70.66%	H 11.55%	N 4.14%

N-Benzoylderivat der Erdnußphytoglykolipidsphingosine

Aus 2 g Erdnußphytoglykolipidsphingosinen wurde nach einer Vorschrift von CARTER³¹⁾ das N-Benzoylderivat dargestellt. 2 g Erdnußphytoglykolipidsphingosine suspendierten wir in einer Mischung von 75 ml Äther und 20 ml 1n NaOH-Lösung, fügten in Portionen von jeweils 0.4 ml insgesamt 1.4 ml Benzoylchlorid hinzu, ließen das Gemisch einige Zeit stehen und trennten die Ätherphase von der wässrigen Phase ab. Zur Verseifung etwa vorhandener O-Benzoylgruppen ließen wir auf den in 30 ml Methanol aufgenommenen Trockenrückstand der Ätherphase 10 Stunden lang 5 ml einer gesättigten wässrigen KOH-Lösung einwirken. Nach Entfernen des Methanols extrahierten wir die wässrige Phase erschöpfend mit Äther. Die bei Einengen der Ätherphase auf 25 ml ausgefallenen rohen N-Benzoylsphingosinbasen suspendierten wir in kochendem Äther und klärten die Suspension durch tropfenweise Zugabe von Methanol. Das in der Kälte ausgefallene N-Benzoylderivat kristallisierten wir mehrmals aus Äther-Methanol um.

Ausbeute: 0.195 g N-Benzoylsphingosin in Form einer in weißen langen, kristallinen Nadeln kristallisierenden Substanz.

Schmp.: 135.5-136° (nach Kofler, unkor.)

Trocknung des N-Benzoylderivates i.H.V. bei 90°.

C ₂₅ H ₄₁ NO ₄	(419.4)	ber.	C 72.30%	H 9.87%	N 3.34%
C ₂₅ H ₄₃ NO ₄	(421.4)	ber.	C 71.21%	H 10.28%	N 3.32%
		gef.	C 71.65%	H 9.96%	N 3.71%

N-Benzoyltriacetylderivat der Erdnußphytoglykolipidsphingosine

Aus 48.95 mg N-Benzoylsphingosin erhielten wir durch die nach den Angaben von CARTER³¹⁾ vorgenommene Acetylierung mit einem Acetanhydrid-Pyridingemisch (1:1) 26.70 mg N-Benzoyltriacetyl-sphingosine.

Schmp.: 78-79° (nach Kofler, unkor.)

Trocknen des Sphingosinderivates bei 90° i.H.V.

C ₃₁ H ₅₀ NO ₇	(598.7)	ber.	C 67.85%	H 9.18%	N 2.55%
C ₃₁ H ₄₈ NO ₇	(596.7)	ber.	C 68.01%	H 8.85%	N 2.56%
		gef.	C 67.70%	H 8.85%	N 2.80%

Der Berechnung der CH-Werte der einzelnen Derivate wurde das C₁₈-Phytosphingosin zugrunde gelegt.

a) Dünnschichtchromatographie der Erdnußphytoglykolipid-sphingosine

Eindimensionales Verfahren, aufsteigende Chromatographie
(Abb. 6, S.26).

Kieselgel-G, Merck; Laufmittelsysteme: 1,2,3,4,5,6 und 7.

Zweidimensionales Verfahren, aufsteigende Chromatographie
(Abb. 7, S.27)

Die Fließmittel 1,3 und 4 wurden in entsprechender Weise kombiniert. Die R_F-Werte der Sphingosinbasen im zweidimensionalen Verfahren wurden unter Zuhilfenahme von Anhydro-phytogsphingosin als Bezugssubstanz ermittelt.

T a b e l l e 36

Dünnschichtchromatographie der Erdnußphytoglykolipidsphingosine
R_F - Werte

Erdnuß- sphingosine	Laufmittelsysteme							Testsubstanzen
	1	2	3	4	5	6	7	
C ₁₈ -Phyto- sphingosin, C ₁₈ -Dehydro- phytosphin- gosin	0.27	0.39	0.34	0.08	0.15	0.31	0.36	C ₁₈ -, C ₂₀ -Phyto- sphingosine, C ₁₈ -, Dehydro- phytosphingo- sin
C ₁₈ -Dihydro- sphingosin	0.37	0.45	0.45	0.15	0.26	0.35	0.39	C ₁₈ -Dihydro- sphingosin
Substanz I	0.40	0.51	0.51	0.22	0.32			Sphingine
Substanz II	0.52	0.60	0.62	0.43	0.52			O-Methyläther der Sphingosine
Anhydrophyto- sphingosine	0.55	0.65	0.66	0.47	0.59	0.38	0.42	Anhydrophyto- sphingosine
Substanz III	0.72	0.82	0.81	0.70	0.78			?

Nachweis des Dehydrophytosphingosins

Die bei präparativer Dünnschichtchromatographie (Kieselgel-G; CHCl₃-MeOH-H₂O=65:25:4) aus der Zone mit dem R_F-Wert 0.27-0.29 gewonnene Substanz (8.2 mg) wurde für die gaschromatographische Analyse dem Perjodsäureabbau unterworfen. Eine Hälfte der Substanz (4.6 mg) oxydierten wir mit Chromsäure und gaschromatographierten die isolierten Carbonsäuren in Form ihrer Methyl-ester.

Die für das C₁₈-Dehydrophytosphingosin charakteristischen Spaltprodukte Caprinsäure und Glutarsäure und die aus dem C₁₈-Phytosphingosin stammende Pentadecansäure konnten nachgewiesen werden.

b) Gaschromatographie der Erdnußphytoglykolipidsphingosine

Die Sphingosine der Erdnußphytoglykolipide wurden wie üblich mit Perjodsäure und Chromsäure oxydiert und die dabei erhaltenen Aldehyde und Säuren gaschromatographisch untersucht.

T a b e l l e 37

Gaschromatographische Analyse der Erdnußphytoglykolipidsphingosine

Versuchsbedingungen	Oxydations- produkte	Retent.-Zeit Min./Sek.	Zuordnung Sphingosine
Erdnußsphingosine: Säule: 240 mm x 4 mm Füllung: 20% LAC-1R- 296 auf Kieselgur 0.2-0.3 mm; Träger-Gas: 1.34 kg/ cm ² ; 110 ml H ₂ /Min. Temp.: 190°	Pentadecanal Pentadecenal Hexadecanal	6'54'' 7'48'' 9'48''	C ₁₈ -Phyto- C ₁₈ -Dehydrophyto- C ₁₈ -Dihydro-
Erdnußsphingosine: Säule: 120 mm x 4 mm Füllung: 20% Apiezon L Chromosorb W 0.2-0.3 mm Träger-Gas: 0.35- 0.37 cm ² ; 120-140 ml H ₂ /Min. Temp.: 125°	Glutarsäure Adipinsäure Caprinsäure	2'12'' 4'24'' 8'12''	C ₁₈ -Dehydrophyto- C ₁₈ -, C ₂₀ -Dehydro- C ₁₈ -Dehydrophyto- C ₁₈ -Dehydro-
Erdnußsphingosine: Säule: 240 mm x 4 mm Füllung: 20% LAC-1R- 296 auf Kieselgur 0.2-0.3 mm; Träger-Gas: 1.2 kg/ cm ² ; 115 ml H ₂ /Min. Temp.: 200°	Laurinsäure Myristinsäure Pentadecansäure	1'24'' 1'54'' 2'48''	C ₂₀ -Dehydrophyto- C ₂₀ -Dehydro- C ₁₆ -Dihydro- C ₁₈ -Phyto-
Erdnußsphingosinge- misch/Dehydrophytosphin- gosin: Säule: 120 mm x 4 mm Füllung: 20% Apiezon L auf Chromosorb W 0.2-0.3 mm Träger-Gas: 0.3 kg/ cm ² ; Temp.: 150°	Glutarsäure Caprinsäure	1'06'' 4'12''	C ₁₈ -Dehydrophyto- C ₂₀ -Dehydrophyto- C ₁₈ -Dehydrophyto-
Erdnußsphingosinge- misch/Dehydrophytosphin- gosin: Säule: und Füllung: wie oben Träger-Gas: 0.5 kg/ cm ² Temp.: 200°	Caprinsäure Laurinsäure	0'48'' 1'12''	C ₁₈ -Dehydrophyto- C ₂₀ -Dehydrophyto-

Nach Hydrierung der Erdnußsphingosine, anschließender Perjod-
säureoxydation der hydrierten Basen und Gaschromatographie
der Oxydationsprodukte, konnte nur mehr Pentadecanal nachge-
wiesen werden.

B. Sphingolipide aus höheren Pflanzen und aus Mikroorganismen

I. Qualitative Nachweismethoden für Sphingolipide

Die P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e führten wir auf Formaldehydpapier, das nach dem Verfahren von HÖRHAMMER⁶⁹⁾ durch imprägnieren von Chromatogrammpapier Schleicher u. Schüll 2043 b oder Ederolpapier Nr. 208 mit einer 35%-igen Formaldehydlösung hergestellt worden war, nach der aufsteigenden Methode im eindimensionalen Verfahren aus.

Zusammensetzung des Fließmittels:

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5; Oberphase)⁶⁹⁾

Laufzeit: 15-16 Stunden

Laufhöhe: 20-25 cm

Die Chromatographie erfolgte bei einer Temperatur von 20-25°.

Sämtliche Substanzen wurden in Chloroform, Chloroform-Alkoholgemischen oder Pyridin gelöst auf die Startlinie der Papyrogramme punkt- oder strichförmig aufgetragen. Im Mittel wurden folgende Substanzmengen für den chromatographischen Nachweis verwendet:

tierische oder mikrobielle Sphingolipide:	50-100 µg
Gesamtphosphatidgemische:	150-300 µg
Phytoglykolipide:	80-160 µg
Mykoglykolipide:	70-150 µg

Anfärbereagentien:

1. Ammoniummolybdat-Perchlorsäurereagens⁷²⁾
2. Nilblaulösung⁷¹⁾
3. Rhodamin-B-Lösung⁷⁰⁾
4. Ninhydrinreagens¹¹⁷⁾

Die D ü n n s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i e der S p h i n g o l i p i d e nahmen wir bei 20-24° auf aktivierten Kieselgel-G-Platten, Merck in für die einzelnen Trennprobleme geeigneten Fließmitteln vor.

Auftragsmenge: etwa 50-100 µg Sphingolipidgemische in CHCl_3 oder Pyridin gelöst
etwa 25-50 µg Reinsphingolipide in CHCl_3 oder Pyridin gelöst.

Identifizierung der einzelnen Substanzen: Anhand bereits bekannter R_f -Werte, durch Vergleich mit authentischen Substanzen oder durch differenzierende Anfärbung.

Testsubstanzen: die unveresterten und veresterten Cerebroside des Rinderhirns, die Cerebrine der Candidahefe und ihre Anhydroformen, ein Phytoglykolipid und ein Sterolglykosid aus Sojabohnen.

Zusammensetzung der Fließmittel:

1. CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4)¹⁰⁸⁾, Laufzeit: 2 - 2 1/4 Std.
Laufhöhe: 14-16 cm
2. CHCl_3 -MeOH (90:10), Laufzeit: 1 1/2 Std.
Laufhöhe: 15-16 cm

Anfärbeverfahren:

1. Alkalische Bromthymolblaulösung¹⁰⁹⁾:
40 mg Bromthymolblau auf 100 ml 0.01 n NaOH. Es färbten sich alle Lipide an.
2. Alkoholische Rhodamin-B-Lösung:
0.05%-ige äthanolische Lösung. Es färbten sich alle Lipide an.
3. Bialsches Reagens nach KLENK und LANGERBEINS⁸⁶⁾:
Cerebroside und Sterolglykoside gaben rotviolette Flecken auf weißem Grunde. Cerebrine und Sterine ließen sich mit diesem Reagens nicht anfärben.
4. Liebermann-Burchardsches-Reagens¹¹⁸⁾: Sterolglykoside ergaben rotviolette, Sterine blauviolette, Cerebrine und Cerebroside dunkelgraue Flecken auf weißem Grunde.
5. Alkoholische Phosphormolybdänsäurelösung:
10%-ige äthanolische Lösung. Sterine, Cerebrine, Cerebroside und Sterolglykoside erschienen als blauschwarze Flecken auf schwach grauem Untergrunde.

II. Isolierung und Reindarstellung von Erdnußphytoglykolipid- komplexen

Gewinnung der Phosphatide aus den Erdnußsamen

Die zur Extraktion der Phosphatide verwendete Frischdroge besaß einen Neutralfett- und Ölanteil von 52.29%, der Gehalt an Gesamtlipiden belief sich auf 61.81%. 0.649% der Frischdroge = 1.05% der Gesamtlipide bestanden aus Phosphatiden. Der Phosphatidanteil setzte sich aus 44.5% Lecithin und 55.5% Colaminkephalin, MPI, PS und PGL zusammen (N = 1.37%; P = 3.19%; Sphingosin-N = 0.089%; Zucker = 5.3%). Phytoglykolipidgehalt der Droge: 0.075% = 11.55% der Gesamtphosphatide.

1.5 kg im Multimix zerkleinerte Erdnußsamen wurden jeweils mehrere Tage lang im Soxhletapparat mit je 4.5 l Äther, Methanol, Chloroform und Methanol-Chloroform (1:1) erschöpfend extrahiert. Die einzelnen Extrakte wurden am Vakuumrotationsverdampfer unter schonenden Bedingungen vom Lösungsmittel befreit und im Vakuumexsiccator über CaCl_2 und Paraffinschnitzel getrocknet.

Ausbeute an Gesamtextrakt: 853 g = 56.9% der Frischdroge.

Die Gesamtlipide lösten wir in der zweifachen Menge peroxyd-freien Äther und rührten die Lösung langsam in das 5-fache Volumen trockenen Acetons ein. Den Niederschlag fällten wir in gleicher Weise noch 2mal aus einer Ätherlösung mit Aceton aus. Nach Trocknung des Niederschlags verblieben 10.58% (= 0.706% der Frischdroge; = 1.24% des Gesamtextraktes) hellbraunes Pulver, das die Gesamtheit der Esterphosphatide, Inositide und Phytoglykolipide enthielt. Nach einer Methode von FOLCH⁷⁴) gewannen wir aus den 10.58 g Gesamtphosphatiden 5.83 g Colaminkephalinfraktion und 4.05 g Folch-I-Fraktion (= 69.3% der Colaminkephalinfraktion; = 38.2% der Gesamtphosphatide), die aus MPI, Lyso-MPI, Phytoglykolipiden und einem geringen Anteil PS bestand.

Gewinnung von Gesamtphosphatiden und Phosphatidfraktionen aus einem Erdnußhandelslecithin

Zur Untersuchung wurde ein von der Fa. Chem.Fabrik Dr.Meyer-Castens u. Co., Hamburg, zur Verfügung gestelltes Handelslecithin verwendet. Das Lecithin besaß einen Fett- und Ölanteil von 48.6-50.6% und einen Gesamtphosphatidanteil von 49.0% (P = 3.28-3.45%; N = 1.47-1.54%; Sphingosin-N = 0.069-0.072%; Zucker = 5.15-5.87%). 32-36% der Gesamtphosphatide bestanden aus Inositiden (P = 4.26%; N = 1.31%; Sphingosin-N = 0.47%; Zucker = 7.3%) und 48% der Gesamtphosphatide aus Colaminkephalin. Der Phytoglykolidgehalt des Handelslecithins betrug 6.75%.

Die G e s a m t p h o s p h a t i d e wurden durch erschöpfende Extraktion des Handelslecithins mit Aceton gewonnen.

Ausbeute an Gesamtphosphatiden: 51.35-51.4% des Erdnußlecithins.

Die I n o s i t i d e des E r d n u ß l e c i t h i n s wurden nach Behandlung der mit Aceton gründlich extrahierten Gesamtphosphatide mit kaltem Eisessig nach den Angaben von CARTER³¹⁾³⁸⁾⁶⁸⁾ erhalten. Die Ausbeute der Reininositide belief sich auf 25.82-29.26% der Gesamtphosphatide. Die Reininositide bestanden aus MPI, Lyso-MPI und Phytoglykolipiden.

Durch fraktionierte Fällung der Gesamtphosphatide aus verschiedenen Lösungsmitteln mit wechselnden Mengen 95%-igen Äthanolis nach der Methode von FOLCH⁷⁴⁾ konnten wir eine Rohfraktion FOLCH-I gewinnen, die 19.5% der Gesamtphosphatide und nach ihrer Reinigung⁶⁵⁾ noch 16.9% der Gesamtphosphatide betrug. Die Folch-I-Fraktion bestand vorwiegend aus MPI, Lyso-MPI, Phytoglykolipiden und einem kleinen Teil PS. Die Zuckerreaktion nach MOLISCH und der Inositest nach SCHERER fielen positiv aus.

a) Die Isolierung von Erdnußphytoglykolipidkomplexen aus Handelslecithin

Die Esterphosphatide des Handelslecithins wurden nach der Methode von SCHMIDT⁷³⁾ durch Behandeln mit Alkali entfernt und aus dem alkalischen Hydrolysat nach den Vorschriften

von CARTER³⁸⁾⁶⁸⁾ das Phytoglykolipid isoliert.

Dazu wurden die mit Aceton erschöpfend extrahierten Erdnußphosphatide (500 g; 195 g) mit einem 5-fachen Überschuß in wässriger Kalilauge 24 Stunden lang bei 37° behandelt. Aus dem mit Ameisensäure angesäuerten Hydrolysat wurde mit der 1 1/2-fachen Menge Aceton das Phytoglykolipid ausgefällt. Das Rohphytoglykolipid (186.4 g; 70 g), das wir in Form eines hellbraunen Pulvers erhielten, machte 37.4% (35%) der Gesamtphosphatide und 19.5% (17.5%) des Erdnußlecithins aus.

Zur Reinigung wurden die mit Sterolglykosiden verunreinigten Rohphytoglykolipide mit Chloroform-Äthanol behandelt³⁸⁾⁶⁸⁾. Dieser Arbeitsgang erübrigte sich bei dem aus den Inositiden gewonnenen Phytoglykolipid, da die Inositide selbst vor ihrer alkalischen Hydrolyse bzw. ihrer Verteilung einer Reinigung durch Chloroform-Alkohol unterworfen wurden und hier bereits die Sterolglykoside entfernt worden waren. Die meisten Phytoglykolipidkomplexe ließen sich weiterhin durch Fällung aus ihrer Pyridinlösung reinigen³⁸⁾⁶⁸⁾. Eine partielle Reinigung wurde durch Dialyse einer Lösung des Phytoglykolipids in wässrigem Alkali gegen destilliertes Wasser erzielt.

Nach Chloroform-Äthanolreinigung von 25 g Rohprodukt betrug die Ausbeute an sterolfreiem Phytoglykolipid 15.7 g (= 23.48% der Gesamtphosphatide; = 12.2% des Erdnußlecithins; = 62.8% der Rohphytoglykolipide). Eine Reinigung des Phytoglykolipids (25.5 g) mit der Pyridin-Äthanolmethode war wegen der schlechten Pyridinlöslichkeit des Phytoglykolipids nur beschränkt möglich. Ein großer Teil der in Pyridin unlöslich verbliebenen Substanz (12.7 g = 11.74% der Gesamtphosphatide; = 6.1% des Erdnußlecithins) bestanden jedoch aus reinem P h y t o - g l y k o l i p i d k o m p l e x I. Ein geringer Teil des zur Reinigung eingesetzten sterolfreien Phytoglykolipids (5.1%) ließ sich aus der Pyridinlösung niederschlagen (1.3 g). Im papierchromatographischen Verhalten der beiden Phytoglykolipide waren keine Unterschiede feststellbar. Ein Teil des Rohphytoglykolipids wurde in bekannter Weise nochmals alkalisch

hydrolysiert und aus dem alkalischen Hydrolysat 71.25% der Ausgangssubstanz (63.9 g; = 26.5% der Gesamtphosphatide) gewonnen. Nach Entfernung der Sterolglykoside mit Chloroform-Äthanol konnten wir einen P h y t o g l y k o l i p i d k o m p l e x II in einer Ausbeute von 52.8% des Rohphytoglykolipids (50 g) erhalten (= 26.4 g; = 12.7% der Gesamtphosphatide). 25 g des sterolfreien Phytoglykolipids II wurden mit der Pyridin-Äthanolmethode gereinigt. Die endgültige Ausbeute an Phytoglykolipid II betrug 21.2 g (= 11.85% der Gesamtphosphatide; = 44.6% des Rohphytoglykolipids; = 31.8% der Ausgangssubstanz). Ein weiteres Phytoglykolipid, P h y t o g l y k o l i p i d k o m p l e x III wurde durch die vorstehend beschriebene alkalische Hydrolyse einer aus den Gesamtphosphatiden stammenden Folch-Fraktion (Darstellung siehe S. 124) gewonnen. Da wir wegen der schlechten Löslichkeit des Phytoglykolipids III in Pyridin auf eine weitere Reinigung mittels der Pyridin-Äthanolmethode verzichten mußten, verarbeiteten wir das Phytoglykolipid mit einem größeren Überschuß an in wässriger Kalilauge zu einer homogenen Suspension und dialysierten mindestens 24 Stunden lang gegen destilliertes Wasser. Durch Zugabe eines 3-fachen Volumens 95%igen Äthanol fällten wir das Phytoglykolipid aus der Dialyselösung aus.

Ausbeute an gereinigtem Phytoglykolipid III: 3.15 g aus 13 g Folch-I-Fraktion (= 7.58% der Gesamtphosphatide; = 3.79% des Erdnußlecithins; = 24.2% der Folch-I-Fraktion).

Zur Gewinnung des P h y t o g l y k o l i p i d k o m p l e x e s IV wurden 50 g der aus den Gesamtphosphatiden erhaltenen Inositide (Darstellung siehe S. 124) wie oben beschrieben alkalisch verseift. Die Ausbeute an Rohphytoglykolipid betrug 25.38 g (= 12.7% der Gesamtphosphatide; = 50.8% der Inositide), die des durch Pyridin-Äthanol-Methode gereinigten Phytoglykolipids 20.8 g (= 10.4% der Gesamtphosphatide; = 41.6% der Inositide; = 81.8% des Rohphytoglykolipids).

Der P h y t o g l y k o l i p i d k o m p l e x V wurde durch Gegenstromverteilung der aus den Gesamtphosphatiden ge-

wonnenen Inositidfraktion erhalten. Die Verteilung der Inositide wurde in Anlehnung an eine von CARTER³⁸⁾ ausgearbeitete Methode durchgeführt. Das zur Verteilung dienende 2-phasige Lösungsmittelsystem setzte sich aus 600 ml Hexan, 400 ml wasser-gesättigtem n-Butanol und aus 200 ml 95%-igem Methanol zusammen. Zur Verteilung benutzten wir 4 Elemente. In jeden der 500 ml fassenden 4 Schütteltrichter gaben wir 100 ml Oberphase und lösten in der 1. Oberphase 5 g gereinigte Erdnußinositide. Nach Art einer Gegenstromverteilung schüttelten wir die 4 Oberphasen mit den 4 Unterphasen gleichen Volumens aus. Nach Beendigung aller Verteilungsschritte erhielten wir getrennt voneinander 4 Hexanphasen und 4 Alkonolphasen. Jede Oberphase war 1mal mit jeder Unterphase ausgeschüttelt worden. In der 1. Hexanphase hatten sich die nur mehr geringfügig mit MPI verunreinigten Phytoglykolipide stark angereichert. Die Hexanphasen 2,3,4 enthielten neben dem Phytoglykolipid noch etwas mehr MPI. Lyso-MPI war in den Hexanphasen kaum zu finden. In den alkoholisch-wässrigen Unterphasen waren dagegen MPI und Lyso-MPI in starker Konzentration neben geringen Mengen an Phytoglykolipiden vorhanden. Zur weiteren Anreicherung der Phytoglykolipide wurden die Hexanphasen 2,3,4 zusammengefaßt, am Vakuumrotationsverdampfer Hexan und Methanol abgedampft und die Phytoglykolipide aus der verbleibenden wässrigen Butanollösung mit einem Überschuß Aceton ausgefällt. Den Niederschlag ließen wir über Nacht im Kühlschrank absitzen. Den trockenen Rückstand verteilten wir nochmals in gleicher Weise, faßten dann wiederum die Hexanphasen 2,3,4 zusammen und wiederholten nochmals die Verteilung mit den aus ihnen gewonnenen Substanzen. Die nach insgesamt 3maliger Verteilung erhaltenen 3 ersten Hexanphasen, die noch mit einer Spur MPI verunreinigt waren, wurden zusammengefaßt und mit der aus ihnen erhaltenen Substanz die Verteilung über 4 Stunden in dem gleichen Lösungsmittelsystem wiederholt. Aus der 1. Oberphase konnten dabei die reinen, MPI-freien Phytoglykolipide in Form eines hellbraunen Pulvers gewonnen werden. Aus insgesamt 8 g Erdnußinositidfraktion erhielten wir 2.4 g reine Phytogly-

kolipide (= 8.05% der Gesamtposphatide; = 30% der Inositidfraktion). Der Verlust an Phytoglykolipiden in den Hexanphasen 2,3,4 und in den 4 Alkoholphasen war geringfügig. Die durch Verteilung isolierten Phytoglykolipide waren in Pyridin ohne Rückstand löslich.

b) Die Isolierung eines Erdnußphytoglykolipidkomplexes aus den Erdnußsamen

Eine nach FOLCH⁷⁴⁾ aus den Gesamtposphatiden gewonnene inositidreiche Fraktion (Folch-I) (Darstellung siehe S.123) wurde in bekannter Weise alkalisch hydrolysiert und aus dem Hydrolysat ein Phytoglykolipidkomplex isoliert (P h y t o g l y - k o l i p i d k o m p l e x VI).

Aus 10.58 g Erdnußphosphatiden (= 0.708% der Droge; = 1.24% der Gesamtlipide) erhielten wir 5.83 g Colaminkephalinfraktion (= 55.2% der Gesamtposphatide; = 0.685% der Gesamtlipide) bzw. 4.05 g Folch-I-Fraktion (= 69.3% der Colaminkephalinfraktion; = 38.2% der Gesamtposphatide). Die Folch-I-Fraktion (4.05 g), die aus MPI, Lyso-MPI, Phytoglykolipiden und PS bestand, wurde in bekannter Weise alkalisch hydrolysiert und aus dem Hydrolysat 1.02 g Rohphytoglykolipid gewonnen (= 9.63% der Gesamtposphatide). Das isolierte Phytoglykolipid war in Pyridin schwer löslich. Es wurde deshalb in gleicher Weise wie das Phytoglykolipid gereinigt.

Ausbeute an gereinigtem Phytoglykolipidkomplex: 0.84 g (= 7.93% der Gesamtposphatide; = 20.07% der Folch-I-Fraktion). Der aus den Erdnußsamen isolierte Phytoglykolipidkomplex zeigte ein gleiches papierchromatographisches Verhalten wie die aus dem Handelslecithin isolierten Phytoglykolipidkomplexe I-IV.

c) Elementaranalysen

Die isolierten Phytoglykolipidkomplexe wurden bei 90° i.n.V. getrocknet.

Der P h o s p h o r g e h a l t der verschiedenen Phytoglykolipidkomplexe wurde nach einer Vorschrift von WAGNER⁷⁶⁾ bestimmt. Messung im Photometer Eppendorf mit dem Filter 772 mμ und der Photozelle 90 r.

Die S t i c k s t o f f b e s t i m m u n g der verschiedenen Phytoglykolipidkomplexe erfolgte nach einer modifizierten Kjeldahlmethode mit 0.1n Borsäure (f. Puffergemische nach Sörensen, Merck) zur Beschickung der Vorlage mit einem Mischindikator, der sich aus 2 Teilen 0.1%iger alkoholischer Methylrotlösung und 1 Teil 0.1%iger alkoholischer Methylenblaulösung zusammensetzte.

T a b e l l e 38

CH-Werte der Erdnußphytoglykolipidkomplexe, berechnet

Phytoglykolipid	%C	%H	%N	%P	Molgew.
$C_{66}H_{124}N_2PO_{28}(Ca-)$	54.05	8.53	1.91	2.03	1464.6
$C_{65}H_{124}N_2PO_{29}(Ca-)$	53.60	8.63	1.90	2.11	1468.6
$C_{65}H_{123}N_2PO_{28}(Ca-)$	54.20	8.53	1.93	2.13	1451.6
$C_{65}H_{122}N_2PO_{27}(Ca-)$	54.80	8.54	1.95	2.16	1434.6

T a b e l l e 39

CH-Werte der Erdnußphytoglykolipidkomplexe, gefunden

Phytoglykolipid	%C	%H	%N	%P	% Asche
II	51.66	8.21	1.99	1.98	5.43
IV	53.84	8.37	2.23	1.98	6.35
IV	54.19	8.51	1.92	2.12	6.75
(dialysiert)					
V	55.09	8.42	2.06	2.12	5.05

T a b e l l e 40

Bestimmung des Erdnußphytoglykolipidphosphors

Phytoglyko- lipid	Stammlösung mg/ml	Aliquoter Teil, ml	Extinktion (2 cm Küvette)	µg P	% P
I	6.13/5	0.15	1.174	3.91	2.10
	4.95/5	0.15	1.047	3.49	2.33
II	3.7/5	0.25	1.23	4.09	2.22
	5.95/5	0.075	0.521	1.70	2.01
III	6.25/5	0.15	1.35	8.15	2.15
	6.25/5	0.15	1.26	7.68	2.04
IV	9.9/25	0.4	0.91	3.03	1.91
	9.9/25	0.5	1.22	4.05	2.05
V	7.3/5	0.1	0.91	3.03	2.07
	7.3/5	0.075	0.715	2.38	2.17
VI	7.97/5	0.08	0.854	2.60	2.08
	7.97/5	0.08	0.792	2.45	1.93

T a b e l l e 41

Bestimmung des Erdnußphytoglykolipidgesamtstickstoffs

Phytoglykolipid	Einwaage mg	Verbrauch n/100 HCl - -Leerwert n/100 HCl, ml	% N
I	13.95	1.88	1.84
	18.60	2.24	1.74
II	11.21	1.66	2.08
	19.97	2.77	1.99
III	16.50	2.24	1.90
	12.25	1.67	1.91
IV	9.62	1.49	2.15
	13.34	2.11	2.19
V	11.30	1.72	2.10
	10.70	1.61	2.10
VI	16.42	2.24	1.91
	15.70	2.13	1.89

Der N/P-Quotient beträgt bei den Erdnußphytoglykolipidkomplexen 2:1, der Gesamtstickstoff/Sphingosin-N-Quotient 2:1.

Optische Drehung des Erdnußphytoglykolipids IV:

(Mittelwert aus 10 Messungen)

$$\alpha_D^{20} = 51.2^\circ \quad (c = 4.6 \text{ in Pyridin; } d = 2 \text{ dm})$$

IR-Spektrum des Erdnußphytoglykolipids IV:

Charakteristische Banden: 3200-3500 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} ,
1000-1100 cm^{-1} , 2820-2890 cm^{-1} , 1470
 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1235-1240 cm^{-1} und
720 cm^{-1}

Schmelzpunkt des Erdnußphytoglykolipids IV:

Das Erdnußphytoglykolipid IV besaß keinen definierten Schmelzpunkt. Zersetzung unter Verkohlung zwischen 200-240°.

III. Charakterisierung und Strukturaufklärung der Erdnußphyto-
glykolipidkomplexe

- a) Die Phytoglykolipide sind gut löslich in organischen Basen (Pyridin, Morpholin), in beschränktem Umfang löslich in dem zur Verteilung der Inositide verwendeten Lösungsmittelsystem und nach Erwärmen löslich in Dimethylsulfoxyd oder Dimethylformamid. Sie sind in wässrigem Alkali langsam, in wasserhaltigen Chloroform-Methanol- oder Chloroform-Äthanolgemischen schwer, in Benzol, Äther, Wasser und wässrigen Mineralsäuren unlöslich.
- b) Papierchromatographische und quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten der Erdnußphytoglykolipidkomplexe. Zum qualitativen Nachweis wurden 90-200 μg in Pyridin gelöste Phytoglykolipide nach der auf- oder absteigenden Methode, zur quantitativen Bestimmung der Phytoglykolipide nur nach der aufsteigenden Methode auf Formaldehydpapier⁶⁹⁾ im Laufmittelsystem n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5; Oberphase) chromatographiert. Zur Sichtbarmachung wurden die Phytoglykolipide mit wässriger Rhodamin-B- oder Nilblau-

lösung angefärbt.

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Komponenten der Erdnußphytoglykolipidkomplexe I-V wurden die einzelnen Zonen (s. Abb. 21, S. 47) aus den Chromatogrammen ausgeschnitten, genau ausgewogen und die in den Papierflecken vorhandene Menge Phosphor nach der Methode von WAGNER⁷⁵⁾⁷⁶⁾ ermittelt. Aus der bestimmten Menge Phosphor errechneten wir unter Zuhilfenahme eines Umrechnungsfaktors den Gehalt der einzelnen Phytoglykolipidkomponenten. Messung im Photometer Eppendorf mit dem Filter Mg 772 mμ und der Photozelle 90 r. (Tabelle 42, S. 133).

Der Gehalt an Phytoglykolipidkomplex, der durch quantitative Papierchromatographie⁷⁵⁾⁷⁶⁾ bestimmt wurde, betrug bei einem Molekulargewicht des Phytoglykolipids von etwa 1500 bei den Erdnußsamen 0.075%, bei den aus den Erdnußsamen isolierten Phosphatiden 11.55%, beim Erdnußhandelslecithin 6.75% und bei den Phosphatiden des Erdnußhandelslecithins 9.25%.

c) Nachweis der charakteristischen Spaltprodukte der Erdnußphytoglykolipidkomplexe.

Der Nachweis des Inosits wurde mit Hilfe des SCHERER-Test's¹¹⁹⁾ und des FISCHER-KORTEN-Test's¹²⁰⁾ durchgeführt. Zucker wurde mit der Molischen-Zuckerreaktion, Hexuronsäure mit dem Carbazoltest nach DISCHE¹²¹⁾ und Hexosamin mit dem ELSON-MORGAN-Test⁷⁹⁾ nachgewiesen. In dem mit Zinkoxyd, Zinkpulver und Wasser durch 3-stündiges Erhitzen auf 150-160° azfgeschlossenen Erdnußphytoglykolipid ließ sich papierchromatographisch kein Glycerin feststellen.

d) Die Zuckerkomponenten des Erdnußphytoglykolipidkomplexes.

1. Chromatographischer Nachweis der Zuckerkomponenten:

21.55 mg Phytoglykolipid IV wurden zusammen mit 0.5 ml in wässriger S₆hwefelsäure 12 Stunden lang im Trockenschrank bei 100° erhitzt. Das klare saure Filtrat neutralisierten wir durch Versetzen mit kleinen Mengen Ionenaustauscher Dowex 2 (HCO₃⁻-Form) bis zu einem pH von 4.5 und engten die Lösung

T a b e l l e 42

Quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten der Erdnußphytylglykolipidkomplexe (Auszug aus dem Versuchsprotokoll)

Phytogly- kolipid- komplexe	Zonen	Aufgetra- gene Menge µg	Extinkt. 2 µg P	Extinkt. Papier 1 mg Pap.	Papier mg	Extinkt. gem.	Extinkt. absolut µg P	Menge µg P	Phyto- glyko- lipid µg	% Phyto- glykolipid- komplex
I	1	133.0	0.62	0.000575	52.95	0.416	0.319	1.218	60.0	45.4
	2	152.0	0.64	0.000575	49.95	0.15	0.124	0.387	17.8	11.7
	1+2	198.0	0.68	0.00034	81.58	0.881	0.854	2.52	122.5	61.8
	3+4+5	198.0	0.68	0.00034	62.3	0.508	0.486	1.43	66.6	35.4
	5	148.0	0.61	0.000575	17.4	0.106	0.096	0.34	15.0	10.3
II	1	122.0	0.625	0.000575	36.02	0.384	0.364	1.13	55.9	46.4
	2	148.0	0.64	0.000575	47.20	0.168	0.141	0.44	21.4	14.4
	1+2	182.0	0.66	0.00029	74.28	0.88	0.86	2.16	126.0	69.2
	3+4+5	182.0	0.66	0.00029	52.2	0.488	0.473	1.43	69.4	38.4
IV	1	79.2	0.61	0.000575	33.62	0.272	0.232	0.762	39.1	48.7
	2	79.2	0.61	0.000575	33.10	0.094	0.075	0.246	11.85	14.9
	1+2	187.5	0.66	0.00022	75.91	0.834	0.802	2.47	120.4	64.5
	3+4+5	187.5	0.66	0.00022	64.5	0.467	0.443	1.355	67.65	36.2
V	0	102.2	0.72	0.00025	44.21	0.178	0.168	0.469	22.68	22.16
	1	124.1	0.625	0.000575	32.6	0.339	0.324	1.03	50.3	40.9
	2+3	146.0	0.64	0.000575	50.45	0.173	0.144	0.45	21.8	21.9
	1+2+3	102.2	0.72	0.00025	57.00	0.456	0.442	1.22	59.50	55.10
	4-7	102.2	0.72	0.00025	26.46	0.121	0.115	0.326	15.55	15.25

zur Sirupdicke ein und chromatographierten nach der absteigenden Methode auf Schleicher u. Schüll-Chromatogrammpapier 2043 bgl und 2040 bgl bei Raumtemperatur in den Fließmittelsystemen

A. Äthylacetat-Eisessig-Wasser (3:1:3; Oberphase)

B. n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5; Oberphase)

C. n-Butanol-Pyridin-Wasser (7:4:3 oder 6:4:3).

Zur Anfärbung der chromatographierten Zucker verwendeten wir ammoniakalische Silbernitratlösung¹²²⁾, Aniliphtalatreagens¹²³⁾, m-Phenylendiaminlösung¹²⁴⁾, Ninhydrinreagens¹¹⁷⁾ und benzolische Bleitetraacetatlösung¹²⁵⁾. Ammoniakalische Silbernitratlösung färbte Inosit erst in der Wärme an. Die übrigen vorhandenen Kohlenhydrate reduzierten Silbernitrat bereits bei Zimmertemperatur. Mit Bleitetraacetat bildete Inosit einen weißen Fleck auf braunem Grunde. Auf den mit Ninhydrin behandelten Chromatogrammen trat Glukosamin als rotvioletter Fleck in Erscheinung. Außerdem ließ sich das Glukosamin mit dem ELSON-MORGAN-Reagens¹²⁶⁾ dunkelrot anfärben.

T a b e l l e 43

Papierchromatographie der Erdnußpnytoglykolipidsaccharide

RM-Wert

(Bezugssubstanz Glukosamin = 1)

Fließmittel Papier	Laufzeit Stunden	Arabi- nose	Mannose	Galak- tose	Gluko- samin	Inosit	Glukuron- säure
A/2043 bgl	24-48	2.10	1.80	1.42	1.0	0.79	3.0
A/2040 bgl	20-23	1.93	1.66	1.33	1.0	0.73	2.1
B/2040 bgl	24-48	1.87	1.69	1.33	1.0	0.61	2.7
C/2043 bgl	27-30	1.49	1.49	1.17	1.0	0.44	
C/2040 bgl	14-20	1.31	1.34	1.09	1.0	0.48	

2. Quantitative Bestimmung der Hexosen und Pentosen des Erdnuß- phytoglykolipidkomplexes

Diese erfolgte nach der Methode von MALLOV⁷⁷⁾.

2-6 mg Substanz wurden mit 3n wässriger Schwefelsäure in einer zugeschmolzenen Glasampulle 3 Stunden lang bei 100° hydrolysiert. Extrahieren der Hydrolysenlösung mit 5 ml CHCl_3 und Auffüllen der filtrierten Lösung auf 10 ml. 2 ml des wässrigen gekühlten Hydrolysates wurden mit NaOH auf pH 4-7 gebracht, tropfenweise 6%ige wässrige Ammoniumreineckatlösung bis zur leichten Rosafärbung der überstehenden Lösung zugegeben, die Lösung filtriert und das Filtrat auf 5 ml gebracht. 2 ml des gekühlten Filtrates wurden mit 5 ml 0.2%iger Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure versetzt, 4 Min. lang im kochenden Wasserbad erhitzt und die abgekühlte Probe im Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q bei 620 m μ gegen eine entsprechende Blindlösung ausgemessen. Mit authentischer Galaktose wurde eine Eichkurve angelegt. Vorversuche zeigten, daß Glukosamin, Glukuronsäure und Inosit die Bestimmung nicht störten.

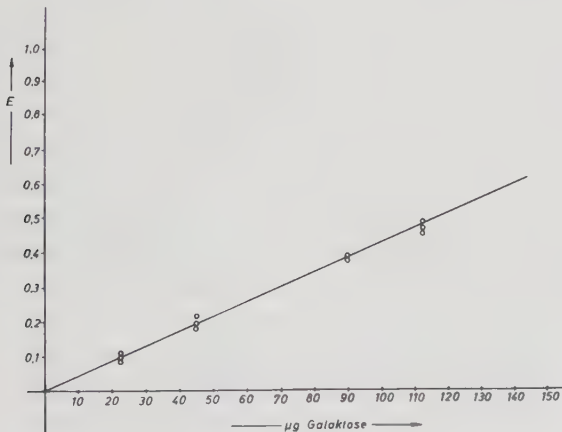


Abb. 39
Galaktose-Eichkurve

T a b e l l e 44

Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Hexosen und Pentosen

Phytoglykolipid	Einwaage mg	Extinktion	µg-Zucker	% Zucker
II	4.80	0.206	51.3/422.0	8.80
	5.95	0.234	58.35/476.75	8.05
V	5.45	0.201	48.6/610.94	11.21
	5.45	0.218	52.6/657.81	12.09
IV	2.98	0.155	54.81/310.94	10.20
	2.98	0.256	63.87/319.37	10.72

3. Isolierung und quantitative Bestimmung des Inosits und des

Glukosamin

Wir isolierten das Inosit und das Glukosamin nach der Methode von CARTER⁶⁸⁾

a) Isolierung des Inosits:

0.85 g Erdnußphytoglykolipidkomplex IV wurden mit 80 ml 6n wässriger Salzsäure 6 Stunden lang auf dem kochenden Wasserbad hydrolysiert. Das filtrierte Hydrolysat wurde zur Trockene eingengt, der Rückstand in 3-4 ml Wasser aufgenommen und die Lösung mit dem Ionenaustauscher Dowex 2 (HCO_3^- -Form) auf pH 4 gebracht. Die entsäuerte Lösung wurde auf eine Ionenaustauschersäule aus Amberlite JR 120 (H^+ -Form) aufgebracht, die Säule mit einem 10-fachen Volumen Wasser eluiert und das neutrale Eluat zur Trockene eingengt, der Rückstand in 2 ml Wasser gelöst und die Lösung mit 15 ml 95%igen Äthanol versetzt. Der weiße kristalline Niederschlag wurde gesammelt.

Ausbeute: 19.7 mg

Schmp.: isoliert 224-227° (nach Thiele, unkor.)

authent. 227-228° (nach Thiele, unkor.)

$\text{C}_6\text{H}_6(\text{OH})_6$	(180.1)	ber. C	40.00%	H	6.71%
		gef. C	40.76%	H	6.81%

b) Isolierung des Glukosamins:

Das bei der Isolierung des Inosits verwendete Austauscherharz Amberlite JR 120 wurde mit 250 ml 0.3n wässriger Salzsäure eluiert, das Eluat auf 20 ml eingengt, mit Dowex 2 (HCO_3^- -Form) entsalzt und die Lösung zur Trockene gebracht. Der in 3 ml Wasser gelöste Rückstand von 68.5 mg wurde mit 2-3 Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und die Lösung mit absolutem Äthanol auf ein Volumen von 15 ml aufgefüllt. Nach Versetzen der alkoholischen Lösung mit 2 ml Aceton kristallisierte das Glukosamin-HCl bei -25° aus. Es wurde in gleicher Weise noch mehrmals umkristallisiert.

Ausbeute: 23.5 mg Glukosaminhydrochlorid

Schmp.: isoliert, Chlorhydrat $192-206^\circ$ u.Z. (nach Thiele)

authent., Chlorhydrat $190-210^\circ$ u.Z. (nach Thiele)

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_5\text{NCl}$ (215.6) ber. C 33.42% H 6.08% N 6.50%

gef. C 33.02% H 6.17% N 6.62%

- c) Die Bestimmung des Inositgehaltes der Erdnußphytoglykolipidkomplexe nahmen wir nach einer Methode von BÖHM und RICHLARZ⁷⁸⁾ in der Modifikation von HÜBSCHLER und HAWTHORNE¹²⁷⁾ vor. Aus den Lipidhydrolysaten wurde das Inosit auf papierchromatographischem Wege isoliert und aus den Chromatogrammen eluiert. Nach Zugabe von Perjodsäure zu dem Versuchsansatz und nachfolgender 2 1/2-stündiger Inkubation bei 50° wurde der Perjodsäureüberschuß jodometrisch bestimmt. (Tabelle 45, S. 138).

Reproduzierbarkeit der Methode:

Aufgetragene Menge Inosit, μg : 220 und 275

Gefundene Menge Inosit, μg : 214 und 265.8

Die Abweichung betrug: -2.3 bzw. -3.2%.

T a b e l l e 45

Ergebnis der quantitativen Inositbestimmung nach der Methode von
BÜHM und HÜBSCHER

Phytoglykolipid	Einwaage mg Substanz	ml HCl	Aliquote Hydrolysatmenge ml	Verbrauch n/100 Thio- sulfat ml	% Inosit
II 1mal aus Pyridin ausgefällt	15.36 15.36 10.70	0.31 0.31 0.22	0.02 0.03 0.03	0.685 0.931 1.021	10.51 9.52 10.54
II 2mal aus Pyridin ausgefällt	9.55 9.30 11.55	0.19 0.19 0.24	0.03 0.03 0.026	1.074 0.968 0.83	10.82 10.03 11.56
IV	10.85 10.85 10.85	0.22 0.22 0.22	0.03 0.03 0.03	1.037 0.982 0.902	10.66 10.09 9.27
V	9.0 9.5	0.18 0.14	0.025 0.025	0.83 1.02	10.10 9.20

d) Die quantitative Bestimmung des Glukosamins der Erdnußphytoglykolipidkomplexe geschah in Anlehnung an eine Methode von ELSON und MORGAN⁷⁹⁾ in der Modifikation von BLIX⁸⁰⁾.

Reagens I: 1.6 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 30 ml 32%iger Salzsäure + 30 ml 96%iger alkoholischer Lösung; frisch bereitet.

Reagens II: 0.75 ml Acetylaceton in 25 ml 1.25n Na₂CO₃-Lösung; frisch bereitet.

5-10 mg Erdnußphytoglykolipid wurden mit 3 ml 2n wässriger Salzsäure 14 Stunden lang bei 100° hydrolysiert. Das erkaltete Hydrolysat wurde mit 2-3 ml Wasser in ein Meßkölbchen übergeführt, mit 1-2 Tropfen Methylrot versetzt, mit 4n wässriger NaOH neutralisiert und auf ein Volumen von 10 oder 20 ml aufgefüllt. Proben von 1-2 ml wurden auf 4 ml mit Wasser ergänzt, 4 ml Acetylacetonreagens zugefügt und der Ansatz 20 Minuten lang im verschlossenen Reaktionsgefäß bei 95-100° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden dem Ansatz 16 ml 95%iges Äthanol und 2 ml Ehrlich-sches Reagens zugefügt und die Lösung nach 45-minütigem Stehen

im Zeiss-Opton-Spektralphotometer M 4 Q gegen eine Blindlösung bei einer Wellenlänge von 550 m μ ausgemessen. Mit authentischem Glukosaminchlorhydrat wurde eine Eichkurve angelegt. Zur Umrechnung auf die in der Substanzprobe vorhandenen Mengen freien Glukosamins multiplizierten wir die aus der Eichkurve abgelesene μ g-Menge mit dem Faktor 0.844.

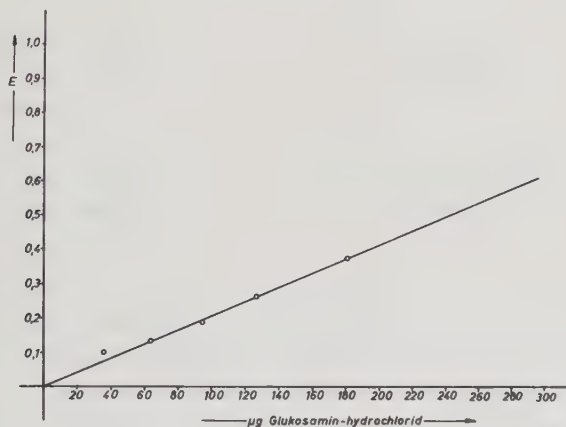


Abb. 40

Glukosaminhydrochlorid-Eichkurve

T a b e l l e 46

Ergebnis der quantitativen Glukosaminbestimmung

Phytogly- kolipid	Einwaage mg	Extinktion	Glukos.-HCl μ g	Glukosamin μ g	Glukosamin %
II	5.55	0.134	63.7	72.0	9.73
	8.95	0.225	107.4	90.3	10.08
IV	7.35	0.148	71.7	60.6	8.26
	10.65	0.251	121.0	101.4	9.55
V	5.65	0.108	52.5	44.5	7.87
	5.15	0.101	48.5	40.8	7.91

4. Papierchromatographischer Nachweis und quantitative Bestimmung der Glukuronsäure

Zum papierchromatographischen Nachweis der Uronsäure wurde das Phytoglykolipid mit 0.5n oder 2n wässriger Schwefelsäure hydrolysiert. Ein Teil des entsalzten, uronsäurehaltigen Hydrolysates trennten wir absteigend auf Schleicher u. Schüll-Papier 2040 und 2043 bgl in den Fließmitteln A. und B. auf. Uronsäuren wandern in diesen Laufmittelsystemen bevorzugt als Lactone. Die angegebenen R_f -Werte sind nicht die der Uronsäure, sondern ihrer Lactone. Als Testsubstanzen verwendeten wir Glukuronsäure puriss. und Glukuronsäurelacton puriss. (Fa. Serva, Entwicklungstechnik, Heidelberg). Die Glukuronsäuren ließen sich sowohl mit dem ammoniakalischen Silbernitratreagens wie mit dem Anilinphthalatreagens anfärben (R_f -Werte siehe Tabelle 43, S. 134).

Zur quantitativen Bestimmung der Uronsäure wurde der nach Umsetzung mit dem DISCHE-Reagens⁸¹⁾ gebildete Farbkomplex im Zeiss-Opton-Spektralphotometer M 4 Q gegen einen entsprechenden Blindwert ausgemessen. Messung bei einer Wellenlänge von 540 m μ . Die Ermittlung der μ g-Mengen Glukuronsäure aus den gemessenen Extinktionen erfolgte anhand einer Eichkurve.

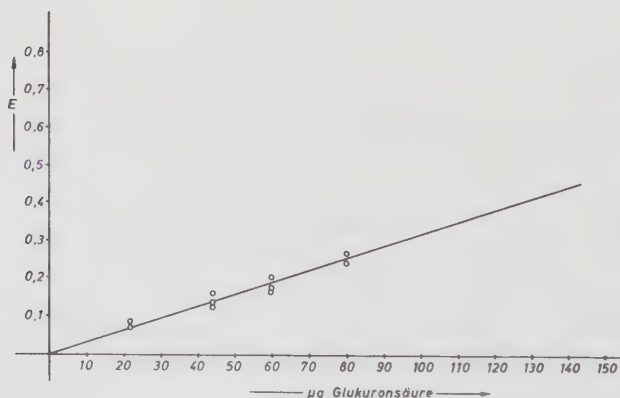


Abb. 41
Glukuronsäure-Eichkurve

T a b e l l e 47

Ergebnis der quantitativen Urnsäurebestimmung

Phytogly- kolipid	Einwaage mg/ml	Aliquoter Teil ml	Extinktion	Glukuronsäure µg	Glukuronsäure %
II	7.95/5	0.5	0.445	145	18.2
	7.95/5	0.5	0.440	145	17.8
IV	9.90/25	1.0	0.176	57.5	14.51
	9.90/25	1.0	0.174	56.8	14.34
V	4.57/5	0.5	0.200	65.1	14.25
	4.57/5	0.5	0.205	65.25	14.30

5. Isolierung und Charakterisierung eines phosphorfreien Oligo- saccharids aus einem Erdnußphytoglykolipidkomplex

Die Isolierung eines phosphorfreien Oligosaccharids nahmen wir nach den Angaben von CARTER⁸³⁾ vor.

10 g Erdnußphytoglykolipid IV wurden mit 500 ml gesättigter Bariumhydroxydlösung 6 Stunden lang auf dem kochenden Wasserbad hydrolysiert. Das heiße Hydrolysat wurde filtriert und das erkaltete Filtrat mit 15n H₂SO₄ auf pH 7.5 gebracht. Nach Abzentrifugieren des niedergeschlagenen Bariumsulfats wurde das Zentrifugat auf 50 ml eingeeengt, mit 1n H₂SO₄ auf pH 1 angesäuert und über eine Celite Hyflo-Supercelpackung filtriert. Einstellen des Filtrates mit Ionenaustauscher Dowex 2 (HCO₃⁻-Form) auf pH 4.5. Aus der auf 30 ml eingeeengten Lösung wurden durch Zugabe von 142 ml absolutem Äthanol die phosphorfreien Oligosaccharide ausgefällt.

Ausbeute: 1.445 g

Die bei der Filtration des Hydrolysates verbliebene getrocknete Substanz wurde 10 Stunden lang mit Äther extrahiert, der Rückstand in 110 ml Wasser suspendiert und mit 2n H₂SO₄ auf pH 1 angesäuert. Die Suspension wurde mit 100 ml CHCl₃ ausgeschüttelt und aus der abgetrennten wässrigen Phase wie oben beschrieben noch 0.4 g Oligosaccharide gewonnen.

Gesamtausbeute an phosphorfreien Oligosacchariden: 1.84 g (= 39% des errechneten Oligosaccharidanteils; Oligosaccharide im

Erdnußphytoglykolipidmolekül, ber.: 47.5%).

Zur Reinigung wurde das phosphorfreie Oligosaccharid mehrmals aus seiner wässrigen Lösung mit Äthanol niedergeschlagen. Ausbeute: 1.12 g (= 23.6% des Oligosaccharidanteils; 11.2% des Erdnußphytoglykolipids)

Schmp.: 232-235° u.Z. (nach Thiele, uncorr.)

$C_{24}H_{40}NO_{21} \cdot 2H_2O$ (714.6)	ber.	C	40.30%	H	6.25%	N	1.96%
$C_{23}H_{40}NO_{21} \cdot 2H_2O$ (702.6)	ber.	C	39.30%	H	6.36%	N	2.00%
$C_{23}H_{39}NO_{20} \cdot 3H_2O$ (703.6)	ber.	C	39.18%	H	6.45%	N	1.99%
	gef.	C	38.12%	H	6.36%	N	1.99%

Der Phosphorgehalt der Substanz betrug 0.18%

Das phosphorfreie Oligosaccharid war in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich. Es löste sich sofort klar und ohne Rückstand in Wasser von Raumtemperatur. Das gereinigte Oligosaccharid chromatographierten wir absteigend auf Chromatogrammpapier 2043 und 2040 b Schl.+Sch. in den Fließmitteln (I) Äthylacetat-Eisessig-Wasser (3:1:1; Oberphase) und (II) n-Butanol-Pyridin-Wasser 6:4:5). Die Anfärbung des Oligosaccharids nahmen wir nach dem Entwickeln der Chromatogramme mit ammoniakalischer Silbernitratlösung vor.

T a b e l l e 48

Papierchromatographie des phosphorfreien Oligosaccharids

RM-Werte

(Bezugssubstanz Inosit = 1.0)

Fließmittel	Papier	Laufzeit Std.	Bezugs- substanz	Oligosaccharid
I	20 40 bgl	24	1.0	0.37
II	2040 bgl	24	1.0	0.35-0.37
II	2043 bgl	48	1.0	0.27-0.30

Eine Probe des Oligosaccharids wurde mit 0.5n wässriger Schwefelsäure hydrolysiert, das Hydrolysat neutralisiert und die vorhandenen Zucker mit den vorstehend beschriebenen papierchromatographischen Verfahren nachgewiesen. Es ließen sich Arabinose, Galaktose, Mannose, Inosit, Glukosamin und Glukuronsäure feststellen.

Die quantitative Bestimmung des Inosits wurde nach der Methode von BOHM⁷⁸⁾ und HÜBSCHER¹²⁷⁾ vorgenommen.

Tabelle 49
Ergebnis der quantitativen Inositbestimmung

Einwaage		Aliquote Hydrolysat- menge	Verbrauch n/100 Thiosulfat	Inosit
mg Substanz	ml HCl	mg	ml	%
9.95	0.20	0.02	1.55	23.97
8.60	0.17	0.02	1.48	22.41
10.25	0.21	0.02	1.56	24.19
10.65	0.22	0.015	1.03	21.66
9.20	0.185	0.01	0.87	23.44
9.85	0.20	0.01	0.97	23.77
12.20	0.25	0.015	1.108	23.25

Die quantitative Bestimmung des Glukosamins, der Glukuronsäure und der Gesamtmenge an Pentosen und Hexosen erfolgte wie im Abschnitt 2, S.135, 3, S.138 und 4, S.140 angegeben.

Tabelle 50
Ergebnis der quantitativen Glukosaminbestimmung

Einwaage	Extinktion	Glukosaminhydro- chlorid	Glukosamin	Glukosamin
mg		µg	µg	%
4.95	0.336	156.0	132.0	26.6
7.25	0.474	225.6	190.6	26.26
4.0	0.263	126.5	105.1	26.01

T a b e l l e 51

Ergebnis der quantitativen Glukuronsäurebestimmung

Einwaage mg/ml	Aliquoter Teil ml	Extinktion	Glukuron- säure µg	Glukuronsäure %
5.32/10	1.0	0.466	149.0	27.9
2.81/10	1.0	0.245	79.0	28.1

T a b e l l e 52

Ergebnis der quantitativen Bestimmung der Hexosen und Pentosen

Einwaage mg	Extinktion	Zucker µg	Zucker %
2.87	0.297	686.5	23.9
2.87	0.295	692.0	24.1
2.87	0.30	695.0	24.2

6. Isolierung und Charakterisierung eines phosphorhaltigen Oligo- saccharids aus Erdnußphytoglykolipid

Das bei der Isolierung des phosphorfreen Oligosaccharids aus Erdnußphytoglykolipidkomplex am Ionenaustauscher adsorbierte phosphorhaltige Oligosaccharid wurde nach den Angaben von CARTER⁸³⁾ mit 0,3n wässriger Schwefelsäure von der Austauschersäule (Dowex 2, HCO_3^- -Form) eluiert, das Eluat mit Bariumhydroxyd neutralisiert, das niedergeschlagene Bariumsulfat abzentrifugiert und das Zentrifugat gefriergetrocknet. Wir charakterisierten die gewonnene Verbindung durch eine 12-stündige Hydrolyse mit 1n wässriger Schwefelsäure bei 100° und nachfolgender Identifizierung der Hydrolysenprodukte. Wir konnten neben Phosphor auf papierchromatographischem Wege Arabinose, Galaktose, Mannose, Inosit, Glukosamin und Glukuronsäure feststellen.

7. Nachweis und Isolierung von Inositmonophosphat

120 mg Phytoglykolipid suspendierten wir in 2.5 ml 6n wässriger Salzsäure und erhitzen den Ansatz 1 Stunde lang im kochenden Wasserbad. Das von Lipiden und überschüssiger Säure befreite und auf etwa 1/5 seines Volumens konzentrierte Hydrolysat verwendeten wir zur Papierchromatographie. Chromatographie aufsteigend auf Chromatogrammpapier 2043 b Schl.+Sch. im Fließmittel Isopropanol-Eisessig-Wasser (3:1:1). Anfärbung der Chromatogramme: ammoniakalische Silbernitratlösung und Ammoniummolybdat-Perchlorsäurereagens nach HANES und ISHERWOOD⁷²).

T a b e l l e 53

Chromatographie der Hydrolysenprodukte des Phytoglykolipids

Substanz	R _F -Werte	Substanz	R _F -Werte
Inositmonophosphat	0.08-0.09	Galaktose	0.34
Inosit	0.15-0.17	Mannose	0.42
Glukosamin	0.29	Arabinose	0.42

0.8 g Erdnußphytoglykolipidkomplex IV hydrolysierten wir mit 16 ml 6n wässriger Salzsäure 1 Stunde lang im kochenden Wasserbad. Ein unlöslicher Rückstand wurde nach mehrstündigem Abkühlen des Filtrates gefriergetrocknet, der Rückstand in 10 ml Wasser aufgenommen und die Lösung über eine Celite Hyflo-Supercelpackung gegeben. Das klare Filtrat versetzten wir mit einem Überschuß an halbgesättigter wässriger Bleiacetatlösung, trennten den gebildeten Niederschlag ab, suspendierten ihn in 10 ml Wasser und behandelten die Suspension 20-30 Minuten lang mit Schwefelwasserstoff. Der Bleisulfidniederschlag wurde entfernt, die Lösung auf 0.5 ml eingengt und durch Zugabe von 25 ml absoluten Äthanol das Inositmonophosphat niedergeschlagen. Ausbeute: 6.75 mg einer weißen, in Wasser gut löslichen pulverigen Substanz.

Schmp.: 199.5-203° unter Zersetzung (nach Thiele, uncorr.)
Chromatographie im Fließmittel Isopropanol-Eisessig-Wasser (3:1:1); R_F-Wert: 0.08-0.09.

8. Isolierung und Identifizierung eines Trisaccharids aus dem Erdnußphytoglykolipidkomplex

0.6 g phosphorfreies Oligosaccharid wurden mit 20 ml 2n wässriger H_2SO_4 30 Minuten lang rückflußgeköcht. Das erkaltete Hydrolysat wurde mit $Ba(OH)_2$ auf pH 7 neutralisiert, das ausgefallene $BaSO_4$ entfernt, die überstehende Lösung auf 10 ml eingengt, mit 1n H_2SO_4 auf pH 1 angesäuert und über Hyflo-Supercel filtriert. Das Filtrat brachten wir mit dem Ionenaustauscher Dowex 2 (HCO_3^- -Form) auf pH 5, engten es auf 5 ml ein und fällten durch Zugabe von absolutem Äthanol das Trisaccharid aus. Das Trisaccharid wurde aus seiner wässrigen Lösung mehrmals mit Äthanol ausgefällt.

Ausbeute: 95.7 mg

Stickstoffwert des Trisaccharids: 2.67% (ber.: 2.70%)

Das Trisaccharid stellte eine weiße feinkristalline Substanz dar, die in Wasser völlig löslich war.

Das Trisaccharid wurde 15 Stunden lang bei 100° mit 0.5n wässriger Schwefelsäure hydrolysiert und das Hydrolysat in bekannter Weise weiterverarbeitet. Eine kleine Probe des neutralisierten Hydrolysates chromatographierten wir absteigend auf Chromatogrammpapier 2040 bgl Schl.+Sch. im Fließmittel B und färbten mit den auf Seite 134 angegebenen Reagentien an. Die nachgewiesenen Zucker sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

T a b e l l e 54

Chromatographie der Bestandteile des Trisaccharids

RM-Werte

(Bezugssubstanz Glukosamin = 1)

Substanz	RM-Werte
Inosit	0.62
Glukosamin	1.0
Glukuronsäure	2.7

T a b e l l e 55

Ergebnis der quantitativen Bestimmung des Inosits nach BÖHM⁷⁸⁾ und HÜBSCHER¹²⁷⁾

Einwaage mg/ml	Aliquoter Teil d. Hydrolysates ml	Verbrauch n/100 Thiosulfat ml	Inosit %
10.15/0.3	0.01	0.719	31.35
10.15/0.3	0.01	0.721	31.25
10.15/0.3	0.01	0.718	31.40

T a b e l l e 56

Ergebnis der quantitativen Bestimmung des Glukosamins nach ELSON und MORGAN⁷⁹⁾⁸⁰⁾

Einwaage mg	Extinktion	Glukosaminhydro- chlorid µg	Glukosamin µg	Glukosamin %
4.58	0.155	85.5	72.25	31.5
4.58	0.153	85.0	71.75	31.35

T a b e l l e 57

Ergebnis der quantitativen Bestimmung der Glukuronsäure nach DISCHE⁸¹⁾

Einwaage mg/ml	Aliquoter Teil d. Hydrolysates ml	Extinktion	Glukuronsäure µg	Glukuronsäure %
2.59/10	1.0	0.277	89.15	34.35
2.59/10	1.0	0.280	89.95	34.70

e) Isolierung und Identifizierung der Fettsäuren des Erdnußphyto- glykolipidkomplexes

1 g Phytoglykolipid (IV) wurde mit 200 ml 6n methanolischer Schwefelsäure durch 8-stündiges Rückflußkochen im Wasserbad hydrolysiert. Aus dem erkalteten, von der Hauptmenge an Methanol

befreiten und mit einem Überschuß an Wasser versetzten Hydrolysat wurden mit Diäthyläther und Petroläther die Fettsäuremethylester ausgeschüttelt. Die Verseifung der Ester nahmen wir mit $n/2$ äthanolischer Kalilauge durch 1-stündiges Erhitzen am Rückflußkühler vor. Das mit der doppelten Menge Wasser versetzte alkalische Hydrolysat wurde mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Waschwässer der Petrolätherphase vereinigten wir mit dem alkalischen Hydrolysat. Das mit in wässriger Salzsäure auf einen pH von 2 angesäuerte Hydrolysat schüttelten wir mit Diäthyläther und einer Mischung aus Diäthyläther-Benzol (1:1) aus. Die extrahierten, getrockneten Fettsäuren lösten wir in einem großen Überschuß Petroläther und filtrierten die Lösung über eine 1cm hohe Packung aus Hyflo-Supercell (Celite, Mansfield). Die gereinigten Fettsäuren wurden durch Gefriertrocknung von den letzten Spuren Feuchtigkeit befreit.

Ausbeute: 0.32 g Rohfettsäurefraktion

0.23 reine, unveresterte Fettsäuren (= 23.71% des Phytoglykolipids; ber.: 25.7-27.4% des Phytoglykolipids).

Die Fettsäuren wurden gaschromatographisch untersucht.

Gaschromatographie der Fettsäuren:

Das Gemisch der Fettsäuremethylester wurde in einem Apparat der Fa. Barber Colman, Rockford, Illinois mit Hilfe einer polaren und unpolaren Säule aufgetrennt.

Die Durchführung der gaschromatographischen Analysen besorgte Herr Professor Dr.G. Clement, Université de Dijon, Faculté des Sciences, Dijon.

Daten der polaren DeGS-Säule: Säulenlänge: 1.82 m; Arbeitstemperatur: 186°; Gasdruck: 1.82 kg/cm²

Daten der unpolaren Apiezon L-Säule: Säulenlänge: 0.609 m; Arbeitstemperatur: 190°; Gasdruck: 1.82 kg/cm²

T a b e l l e 58

Ergebnis der gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren
Die Retentionszeiten der einzelnen Fettsäureester bei Chromatographie an einer polaren(A) und einer unpolaren(B) Säule

Fettsäuren	A	Retent.- Zeiten Minuten	Fettsäuren.	B	Retent.- Zeiten Minuten
Laurinsäure		1.69	Laurinsäure		2.32
Myristinsäure		2.92	Myristinsäure		3.34
Palmitinsäure		5.08	Palmitinsäure		4.65
Stearinsäure		8.75	Stearinsäure		8.58
Ölsäure		10.15			
Linolsäure		12.60			
Linolensäure		19.80			
Arachinsäure		15.40	Arachinsäure		33.3
Behensäure		26.50	Behensäure		69.2
Arachidonsäure		34.90			
Lignocerinsäure		46.00	Lignocerinsäure		150.0
Hydroxybehensäure		101.2	Hydroxybehensäure		106.5
Cerebronsäure		178.5	Cerebronsäure		216.0
Hydroxycerotinsäure		-	Hydroxycerotinsäure		393.0

Herkunft der Testsubstanzen:

Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure	Fa.E.Merck, A.G., Darmstadt
Arachin-, Behen-, Lignocerin- und Cerotinsäure	Fa.C.Roth, Karlsruhe
α -Hydroxycerotinsäure	Fa.Fluka, A.G., Buchs SG/Schweiz
α -Hydroxystearinsäure und Cerebronsäure	Dr.H.Jatzkewitz, Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie, München
α -Hydroxybehensäure	Prof.Dr.K.K.Carroll, University of Western Ontario, London, Canada
Cerebronsäure im Gemisch mit α -Hydroxycerotinsäure	aus Torulahefecembrin isoliert

- f) Isolierung, Nachweis und Charakterisierung eines Ceramids und eines Ceramidphosphats aus dem Erdnußphytoglykolipidkomplex

1. Isolierung des Ceramids

Der wasserunlösliche Rückstand (6.85 g) des barytalkalischen Hydrolysates von 10 g Erdnußphytoglykolipid wurde 6-7 Stunden lang mit Äther extrahiert und die Ätherphase zur Trockene eingengt. Der Rückstand (0.11 g) wurde aus einem größeren Überschuß Methanol bei 4-6° fraktioniert. Die zuerst aus kaltem Methanol ausgefallene Substanz kristallisierten wir noch 2mal aus Methanol um.

Ausbeute: 24.2 mg

Schmp.: 110-114° (nach Thiele, uncorr.)

Stickstoffgehalt: 2.12% (ber.: 1.96-2.20%)

Das Ceramid war eine weiße kristalline Substanz, die in CHCl_3 oder CHCl_3 -MeOH-gemischen gut löslich, in MeOH und Äther weniger gut löslich, in der Wärme in MeOH jedoch gut löslich war.

Auf Kieselgel-G-Platten im Fließmittel CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4) chromatographiert besaß das chromatographisch einheitliche Ceramid einen R_f -Wert von 0.86-0.88. Anfärbung mit Bromthymolblau. Keine Reaktion mit Ninhydrinreagens.

6.5 mg Ceramid hydrolysierten wir durch sechsständiges Rückflußkochen mit der 100-fachen Menge 2n methanolischer Salzsäure. Das salzsaure Hydrolysat wurde nach Extraktion der Fettsäuren mit Petroläther stark alkalisch gemacht und mit Diäthyläther die Sphingosinbasen ausgeschüttelt. Die Sphingosinbasen des Ceramids untersuchten wir dünn-schichtchromatographisch mit dem aus Seite 87 beschriebenen Verfahren.

Das Fettsäuregemisch der Ceramidfraktion trennten wir mit dem papierchromatographischen Verfahren von KAUFMANN¹²⁸⁾129) und mit dem dünn-schichtchromatographischen Methoden von JATZEKOWITZ¹⁰⁹⁾ auf.

2. Isolierung des Ceramidphosphats

Die bei der Darstellung des Ceramids in Äther unlöslich verbliebene Fraktion suspendierten wir in 100 ml Wasser, säuerten die Suspension mit in wässriger Schwefelsäure auf pH 1 an und schüttelten mit Chloroform aus. Die klaren Chloroformphasen wurden zur Trockene eingeengt, der Rückstand (4.15 g) mit 770 ml heißem Pyridin extrahiert und das Unlösliche abzentrifugiert und das auf 25 ml konzentrierte Zentrifugat mit einem 5-fachen Volumen Aceton versetzt. Die niedergeschlagene Substanz wuschen wir mit Aceton und 0.5n Salzsäure und kristallisierten sie mehrmals aus 95%igem Äthanol aus.

Ausbeute: 115 mg

Schmp.: 140-143⁰ (nach Thiele, unkor.)

Stickstoffgehalt: 1.89% (ber.: 1.77-1.96%)

Phosphorgehalt: 4.15% (ber.: 3.90-4.34%)

Das Ceramidphosphat war eine weiße kristalline Substanz, die in Chloroform, Methanol und Pyridin löslich, dagegen in Äther unlöslich war. Eine Probe des Ceramidphosphats wurde unter sechsstündigem Rückflußkochen mit der 100-fachen Menge 2n methanolischer Salzsäure hydrolysiert, aus dem Hydrolysat mit Petroläther die Fettsäuren isoliert und das alkalisierte Hydrolysat zur Gewinnung der Sphingosinbasen mit Diäthyläther extrahiert.

Die Untersuchung der Sphingosinbasen und der Fettsäuren erfolgte wie unter 1., S. 150, beschrieben.

IV. Isolierung und Reindarstellung der Sphingolipide aus Candida utilis und Saccharomyces cerevisiae

Charakterisierung der untersuchten Hefen

Bei einer unter der Bezeichnung Torulahefe von der Zellstofffabrik Waldhof, A.G., Mannheim zur Verfügung gestellten Hefe handelte es sich um *Candida utilis* (Fungi imperfecti; Cryptococcaceae; Cryptococcoideae). 17.73% der Trockenhefe bestanden aus Lipiden und 3.13% aus Phosphatiden.

Bei einer anderen unter der Bezeichnung Oberkoltzauer Preßhefe im Handel erworbenen Hefe handelte es sich um eine Hefe der Gattung *Saccharomyces* (Ascomycetes; Saccharomycetaceae; Saccha-

romycetoideae). Die Handelsform der Preßhefe enthielt 28% Trockensubstanz.

19.35% der Trockenhefe bestanden aus Lipiden und 2.45% aus Phosphatiden.

Das durch Gefriertrocknung gewonnene Hefetrocknenpulver wurde 2mal mit der 3.5-fachen Menge eines Chloroform-Methanolgemisches (1:1) bei 37° 20 Minuten lang unter kräftigem Rühren extrahiert. Der unlösliche Rückstand wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Das Hefepulver wurde nochmals 20 Minuten lang mit der gleichen Menge Chloroform-Methanol bei 50° extrahiert. Zur Spaltung der Lipidsymplexe und zur Erhöhung der Lipidausbeute schloß sich eine Behandlung der Hefe mit kochendem Methanol an. Das Hefepulver wurde dabei mit der 3.5-fachen Menge Methanol 20 Minuten lang unter Rückflußkühlung gekocht. Der nach Zentrifugieren und Abdekantieren des Überstandes verbliebene Rückstand wurde zuerst noch 2mal 20 Minuten lang mit dem 3.5-fachen Volumen einer Chloroform-Methanol-Wassermischung (10:10:1) und schließlich 2mal je 20 Minuten lang mit einem 3.5-fachen Überschuß einer Mischung aus Chloroform-Methanol-Wasser (10:20:3) in der Siedehitze behandelt. Das Hefepulver wurde abschließend 1mal 20 Minuten lang mit einem Gemisch aus Chloroform-Methanol (1:3) heiß extrahiert. Das klare Filtrat der vereinigten Extrakte wurde bei 37-40° im Vakuum zur Trockene eingeengt. Den feuchten Rückstand versetzten wir mit einem gleich großen Volumen Benzol und engten das Lösungsmittel im Vakuum ab. Diese Prozedur wiederholten wir solange, bis die zurückbleibende Substanz frei von Lösungsmittelresten und Feuchtigkeit war. Der auf diese Weise erhaltene Gesamtextrakt stellte eine hellbraune, fettige, nahezu vollständig in Benzol lösliche Masse dar. Die Ausbeute an Gesamtextrakt betrug bei der Candidahefe 19.13% (= 521.45 g aus 2720 g Trockenhefe), bei der Saccharomyceshefe 21.42% (= 116 g aus 540 g Trockenhefe) der Trockensubstanz. Die Chloroform-Methanolextrakte der Candida- und Saccharomyceshefen wurden nach den Angaben von SCHMIDT⁷³⁾ und CARTER³⁸⁾⁶⁸⁾ mit wässrigem Alkali behandelt und aus dem alkalischen Hydrolysat die Sphingolipidfraktion als grauweißes, fettiges Pulver gewonnen.

Die Ausbeute an unverseifbarer Sphingolipidfraktion, die aus Sterinen, Cerebrinen, Cerebrosid und Mykoglykolipid bestand, belief sich bei der Candidahefe auf 0.235% und bei der Saccharomyceshefe auf 0.38% der Hefetrockensubstanz. Aus 116 g Gesamtlipidextrakt der Saccharomyceshefe erhielten wir 2.05 g unverseifbare Sphingolipidfraktion (= 1.65% des Lipidextraktes) und aus 306.05 g Gesamtlipidextrakt der Candidahefe 2.38 g unverseifbare Sphingolipidfraktion (= 0.77% des Lipidextraktes; = 0.145% der Trockensubstanz) bzw. aus 213 g Gesamtlipidextrakt der Candidahefe 4.0 g unverseifbare Sphingolipidfraktion (= 1.88% des Lipidextraktes; = 0.364% der Trockensubstanz). Gesamtausbeute an unverseifbarer Sphingolipidfraktion aus Candidahefe: 6.38 g (= 1.32% des Gesamtlipidextraktes; = 0.235% der Trockenhefe). Die wachsartige in Pyridin oder Pyridin-Chloroformgemischen vollständig lösliche Sphingolipidfraktion löste sich nur teilweise in Äther oder Chloroform.

Die chromatographische Untersuchung der Hefesphingolipidfraktionen führten wir wie im Abschnitt B/I., S. 121 beschrieben durch. Die Sphingolipide wurden auf Kieselgel-G-Platten in den Laufmittelsystemen 1 und 2 chromatographiert (Abb. 25, S. 63). (Tabelle 59, S. 154).

Die unverseifbare Substanz wurde auf Formaldehydpapier⁶⁹⁾ aufsteigend im Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5; Oberphase) chromatographiert und die entwickelten Papyrogramme mit wässriger Rhodamin-B-Lösung und mit dem Ammoniummolybdat-Perchlorsäurereagens nach HANES-ISELEWOOD⁷²⁾ angefärbt.

T a b e l l e 59

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Hefesphingolipide

Sphingolipide	Fließmittel	Laufhöhe cm	R _F -Werte		
			Sterine	Cerebrine	Cerebro- side
Saccharomyces-	CHCl ₃ -MeOH (90:10)	15.6	0.82-0.91	0.62 0.45 0.30	
Candida-	CHCl ₃ -MeOH (90:10)	15.6	0.77-0.91	0.68 0.62 0.56 0.45 0.30	0.154
Cerebrine/Test	CHCl ₃ -MeOH (90:10)	15.6		0.62 0.45 0.30	
Cerebroside/ Test	CHCl ₃ -MeOH (90:10)	15.6			0.23 0.154

T a b e l l e 60

Papierchromatographische Auftrennung der Hefesphingolipide

Hefen	R _F -Werte der Sphingolipide					
	Cerebrine gef.	Cerebrine Test	Cerebroside gef.	Cerebroside Test	Mykogly- kolipide gef.	Phyto- glyko- lipide Test
Saccharo- myces	0.94-0.96	0.94-0.96	0.83-0.86	0.82-0.85	0.22-0.40	0.22- -0.38
Candida	0.94-0.96	0.94-0.96	0.80	0.82-0.85	0.30-0.40	0.22- -0.38

1. Fraktionierung des Sphingolipidgemisches aus Candida- und Saccharomyceshefe mit Hilfe von Lösungsmitteln

Ätherextraktion:

Das Sphingolipidgemisch aus Candida utilis-Hefe (5.55 g = 0.254% der Trockenhefe) wurde mit einem großen Überschuß an peroxydfreiem Diäthyläther 20 Minuten lang am Rückfluß gekocht. Der von der warmen Ätherlösung abgetrennte Rückstand (4.65 g)

wurde noch 3mal je 20 Minuten lang mit einem etwa 10-20-fachen Überschuß heißen Äthers behandelt. Der nunmehr auf dem Filter verbliebene und mit Äther noch mehrmals ausgewaschene Rückstand (4.32 g) wurde oberflächlich getrocknet und zur weiteren Fraktionierung mit Alkohol verwendet. Der Rückstand der ätherischen Lösung wurde in einem Mikrosoxhletapparat solange mit Diäthyläther extrahiert, bis im Ätherextrakt chromatographisch keine Sterine mehr nachweisbar waren und in der Extraktionshülse ein sterinfreies Gemisch aus Cerebrinen und Mykoglykolipiden zurückgeblieben war. Die feste, fettige und weißgelbe Substanz des Ätherextraktes bestand in der Hauptsache aus Sterinen und Kohlenwasserstoffen und enthielt nur einen geringen Teil Cerebrine.

Candida-Ätherextrakt: 1.23 g = 22.2% der unverseifbaren Sphingolipidfraction = 0.056% der Trockenhefe

Alkoholextraktion:

Die ätherunlösliche Substanz (4.32 g) wurde mit einem größeren Überschuß 96%igen Äthanols oder 98-99%igen Methanols 4mal je 30 Minuten lang unter Rückfluß extrahiert. Die heiße alkoholische Lösung wurde durch sofortige Filtration vom unlöslichen Rückstand getrennt. Der alkoholunlösliche Rückstand (0.885 g) wurde noch solange mit Alkohol extrahiert, bis er vollkommen frei von Cerebrinen und Cerebrosid war (Mykoglykolipidfraction I). Die Alkoholextraktion entfernte aus dem ätherunlöslichen Rückstand die Cerebrine und Cerebroside. Daneben ging noch ein kleinerer Teil Mykoglykolipid in Lösung. Die weitere Behandlung des Cerebrin-Cerebrosid-Mykoglykolipidgemisches erfolgte durch eine

Chloroformextraktion:

Der Trockenrückstand der alkoholischen Auszüge (2.55 g; = 45.5% der unverseifbaren Sphingolipide; = 0.117% der Trockenhefe) wurde mehrmals je 15 Minuten lang mit einem größeren Volumen heißen Chloroforms extrahiert. Unlösliches und Lösungsmittel wurden durch Filtration sofort voneinander getrennt und die chloroformunlösliche, mit heißem Chloroform ausgewaschene Substanz getrocknet. Auf diese Weise konnte eine zweite, cerebrin-

und cerebrosidfreie Mykoglykolipidfraktion (0.0991 g) gewonnen werden. Die Cerebrin-Cerebrosidfraktion war noch geringfügig mit Mykoglykolipid verunreinigt und wurde deshalb in einem Extraktor mit warmem Methanol (98-99%ig) ausgezogen. Es fiel eine größere Menge mykoglykolipidfreier Cerebrin-Cerebrosidfraktion an.

Aus 2.05 g Sphingolipidgemisch aus *Saccharomyces cerevisiae*-Hefe (= 0.38% der Trockenhefe) gewannen wir in der gleichen Weise 0.65 g Ätherextrakt (= 31.65% der Gesamtsphingolipide; = 0.12% der Trockenhefe) und 0.70 g Alkoholfraction (= 34.1% der Gesamtsphingolipide; = 0.1295% der Trockenhefe). Die Trennung des Cerebrins und des Cerebrosids gelang mit diesen Methoden nicht.

Die Mykoglykolipidfraktionen der *Candida utilis*-Hefe (0.9841 g) und der *Saccharomyces cerevisiae*-Hefe (0.1203 g) wurden nach CARTER⁶⁸) gereinigt, indem die Substanz im 25-fachen Volumen Pyridin gelöst und mit einem doppelten Volumen 95%igen Äthanol wieder ausgefällt wurde.

Ausbeute an Candida- und Saccharomycesmykoglykolipiden:

Candidamykoglykolipid: Molgew. etwa 1200

Mykoglykolipid (durch quantitative Papierchromatographie ermittelt): 0.0932% der Trockenhefe; = 39.4% der unverseifbaren Sphingolipide

Mykoglykolipid (nach oben beschriebener Methode gewonnen):

0.0427% der Trockenhefe (0.9311 g Mykoglykolipid aus 2180 g Trockenhefe)

Saccharomycesmykoglykolipid: Molgew. etwa 1200

Mykoglykolipid (durch quantitative Papierchromatographie ermittelt): 0.1146% der Trockenhefe; = 38.4% der unverseifbaren Sphingolipide

Mykoglykolipid (nach oben beschriebener Methode gewonnen):

0.035% der Trockenhefe (0.19 g Mykoglykolipid aus 540 g Trockenhefe)

Dünnschichtchromatographie der Sphingolipidfraktionen:

(Abb. 25, S. 63); Kieselgel-G-Platten; Fließmittel: CHCl_3 -MeOH (90:10).

Papierchromatographie der Sphingolipidfraktionen:

Formaldehydpapier⁶⁹⁾; n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5; Oberphase), Anfärbung der Chromatogramme mit Rhodamin-B-Lösung und mit Nilolaulösung. Die papierchromatographische Untersuchung der Sphingolipidfraktionen diente vor allem dem Nachweis des Mykoglykolipids in den Äther- und Äthanolextrakten der Candida- und Saccharomyces-sphingolipidgemische.

R_F-Wert der Mykoglykolipide: 0.22 - 0.40

2. Isolierung von Mykoglykolipiden, Cerebrinen und Cerebrosid aus Candidahefe durch Säulenchromatographie

Ein Sphingolipidgemisch aus Candidahefe, hergestellt durch erschöpfende Extraktion des Unverseifbaren der Hefe mit Alkohol, wurde durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule in seine Hauptbestandteile zerlegt.

Adsorbens: Kieselgel-G für Säulenchromatographie, Merck 0.2-0.5 mm

Eluens: Die Eluierung der Säule begannen wir mit reinem Chloroform, dem steigende Mengen Methanol p.a. zugesetzt wurden (jeweils 2.5 oder 5% mehr Methanol als das vorhergehend benutzte Methanol-Chloroformgemisch enthielt).

Säulengröße und Menge des Adsorbens: Die mittlere Belastung der Säule betrug etwa 2.5-5.0 mg Substanz pro 1 g Adsorbens. Wir bewaßen die Dimensionen der Säule, deren Länge zu ihrem Durchmesser in der Regel in einem Verhältnis von 20:1 stand, so, daß etwa 3/4 durch das mit dem Eluierungsmittel äquilibrierte Adsorbens gefüllt war.

Auftragsmenge: 0.2676 g

Das Kieselgel (50 g) wurde in einem größeren Überschuß Chloroform-Methanol (2:1) suspendiert und die Suspension in die Glassäulen eingeschlämmt. Nach dem Absitzen des Adsorbens eluierten wir die Packung mit einem mehrfachen Volumen eines Chloroform-Methanolgemisches (2:1). Mit reichlich reinem Chloroform wurde die Säulenfüllung bis zur völligen Farblosigkeit und Transparenz ausgewaschen. Nach dem Aufbringen der in warmem Chloroform gelösten Substanz (0.2676 g) auf die Säule wurde mit Chloroform bzw. Chloroform-Methanolgemischen (Tropfge-

schwindigkeit von 20 Tropfen/Minute) eluiert. Die Fraktionierung des Eluates erfolgte mit einem automatischen Fraktionsschneider. Kleinere Proben der einzelnen Fraktionen chromatographierten wir auf aktivierten Kieselgel-G-Platten im Fließmittel CHCl_3 -MeOH(9:1). Anfärbung: mit alkalischer Bromthymolblaulösung oder mit alkoholischer Rhodamin-B-Lösung. Mykoglykolipidhaltige Fraktionen wurden mit den bekannten papierchromatographischen Verfahren untersucht.

Bereits durch 1malige Chromatographie des Hefesphingolipidgemisches an einer Kieselgelsäule konnten wir aus einer Reihe von Fraktionen Reinsubstanzen gewinnen. Weitere Menge wurden erhalten durch Rechromatographie der bei der Fraktionierung angefallenen Mischfraktionen.

Die säulenchromatographische Auftrennung der Cerebrin-Cerebrosid-Mykoglykolipidgemische erbrachte folgende Ausbeuten an Reinsubstanzen:

Aus 1.0706 g Alkoholfraktion des Unverseifbaren der Candidahefe erhielten wir 0.08089 g Mykoglykolipid (=7.67% der Alkoholfraktion; = 0.0075% der Trockensubstanz). Aus 1.462 g Alkoholfraktion des Unverseifbaren der gleichen Hefe erhielten wir 0.0639 g Cerebrosid (= 4.38% der Alkoholfraktion) und 0.93 g Cerebrine (= 63.7% der Alkoholfraktion).

V. Strukturaufklärung der Mykoglykolipide von Candida utilis und Saccharomyces cerevisiae

Die durch fraktionierte Extraktion gewonnenen Mykoglykolipide stellten eine grauweiße, pulverige Substanz dar, das durch Säulenchromatographie gewonnene Candidamykoglykolipid eine rein weiße und feinpulverige Substanz.

a) Löslichkeitsverhalten der Mykoglykolipide:

Die Mykoglykolipide waren unabhängig von der Art ihrer Gewinnung in Pyridin, besonders unter leichtem Erwärmen gut löslich. Die in kaltem Äther, Methanol, Chloroform und Aceton geringfügig löslichen Mykoglykolipide waren in der Wärme in Methanol, Äthanol, Chloroform oder einer Mischung dieser Lösungsmittel etwas besser löslich. In Wasser war die Substanz

vollkommen unlöslich. Bei Erwärmen (37°) mit in wässriger Kali- oder Natronlauge gingen die Mykoglykolipide kolloidal in Lösung. Nach Ansäuern der alkalischen Lösung konnten sie mit einem Überschuß an Aceton wieder ausgefällt werden.

b) Chromatographisches Verhalten der Mykoglykolipide:

Die Mykoglykolipide machten den Eindruck von chromatographisch einheitlichen Substanzen.

Die Chromatographie erfolgte auf Formaldehydpapier⁶⁹⁾ im Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5). Die Mykoglykolipide waren mit Rhodamin-B-Lösung, Nilblaulösung, Mit Bromthymolblaulösung und mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäurelösung anfärbbar.

<u>R_f-Werte:</u> Candidamykoglykolipid	0.30-0.41
Saccharomycesmykoglykolipid	0.30-0.38

c) Schmelzpunkt der Mykoglykolipide:

Die Mykoglykolipide besaßen keinen definierten Schmelzpunkt; Zersetzung bei höherer Temperatur (über 240°)

d) Elementaranalysen:

Trocknung der Mykoglykolipide i.H.V. bei 90°

$C_{56}H_{109}NPO_{18}$ (Ca-) (1155.4) ber. C 58.21% H 9.50% N 1.21%
P 2.71%

$C_{56}H_{109}NPO_{18}$ (Mg-) (1139.6) ber. C 59.23% H 9.69% N 1.22%
P 2.71%

Candidamykoglykolipid:

Gewinnung durch Lösungsmittelfraktionierung

gef. C 57.40% H 9.29% N 2.09%
P 2.88% Asche 7.60%

Gewinnung durch

Säulenchromatographie gef. C 57.93% H 9.51% N 1.90%
P 2.78% Asche 7.24%

Saccharomycesmakoglykolipid:

Gewinnung durch Lösungsmittelfraktionierung

gef. C 57.35% H 9.21% N 1.96%
P 2.60% Asche 7.58%

Der Phosphorgehalt der verschiedenen Mykoglykolipide wurde nach einer Vorschrift von WAGNER⁷⁵⁾⁷⁶⁾ ermittelt.

T a b e l l e 61

Bestimmung des Phosphorgehalts der Mykoglykolipide

Mykoglykolipid	Stammlösg. mg/ml	Aliquoter ml	Teil Extinktion	Menge P µg	P %
Candida-	5.65/5	0.075	0.515	2.52	2.88
Candida-	2.74/5	0.15	0.485	2.24	2.78
Saccharomyces	3.95/5	0.125	0.408	2.53	2.60

e) Nachweis charakteristischer Spaltprodukte der Mykoglykolipide:
Die Mykoglykolipide gaben eine positive Reaktion auf Inosit
(SCHERER- und FISCHER-KÜRTEN-Fest) und eine positive Molische
Zuckerreaktion.

f) Das IR-Spektrum des Candidamykoglykolipids wies folgende
charakteristische Banden auf:
3200-3500 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1000-1100 cm^{-1} , 2820-
2890 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1235-1240 cm^{-1} und 720 cm^{-1} .

g) Nachweis und quantitative Bestimmung der Monosaccharide:
Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide wurden mit 0.5n oder
2n wässriger Schwefelsäure 12-15 Stunden lang bei 100° hydroly-
siert. Das erkaltete und filtrierte Hydrolysat neutralisierten
wir mit Dowex-2 (Bikarbonatform) bis zum pH von 4.5 und be-
stimmten in einer Probe des neutralisierten Hydrolysates papier-
chromatographisch die einzelnen Zucker. Proben des Hydrolysates
wurden absteigend auf Chromatogrammpapier 2040 b Schl.+Sch. in
den Fließmitteln (I) n-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3) und (II)
Äthylacetat-Eisessig-Wasser (3:1:3) bei Zimmertemperatur chro-
matographiert.

T a b e l l e 62

RM-Werte der in Candida- und Saccharomycesmykoglykolipiden aufge-
fundenen Zucker (Bezugssubstanz = Inosit 1.0)

Substanz	Laufmittel	gefundene Zucker RM-Werte	
		Inosit	Mannose
Candidamykoglykolipid	I	1.0	2.83
	II	1.0	2.23
Saccharomycesmykoglyk.	I	1.0	2.99
	II	1.0	2.26

Die Anfärbung der vom Fließmittel befreiten Papyrogramme nahmen wir in bekannter Weise mit Ninhydrin, ammoniakalischer Silbernitratlösung und butanolischer Anilinphthalatlösung vor.

Die quantitative Bestimmung der Hexose nahmen wir nach einer Methode von MALLON⁷⁷⁾ vor. Mit Hilfe einer Eichkurve, die wir mit Mannose anlegten, bestimmten wir photometrisch den Gehalt an Hexosen.

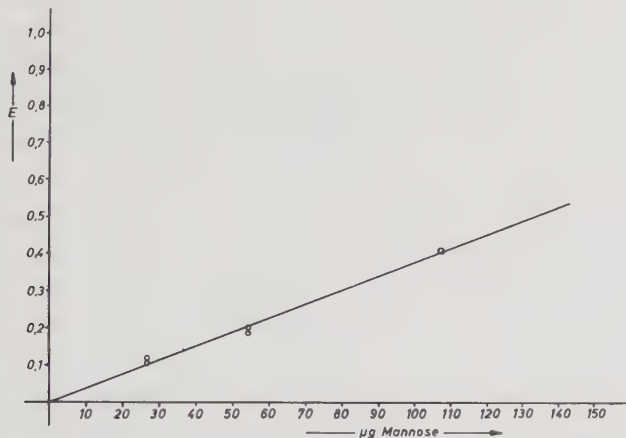


Abb. 42

Mannose-Eichkurve

Tabelle 63

Quantitative Bestimmung der Mannose

Substanz	Einwaage mg	Hydro- lysat ml	Aliquot. Teil ml	Extinktion	Menge Zucker µg	Ges. Menge Zucker µg	Zucker %
Candida- mykoglyko- lipid	2.44 2.44	10 10	1.0 2.0	0.145 0.318	35.5 83.75	355.0 418.75	15.68 17.15
Saccharo- mycesmyko- glykolipid	2.09 2.09	10 10	2.0 2.0	0.265 0.258	69.0 67.16	345.0 335.8	16.50 16.04

Der Inositgehalt der Mykogllykolid wurde mit Hilfe der mikrobiologischen Methode von McKIBBIN¹³⁰⁾ bestimmt. Zur mikrobiologischen Bestimmung des Inosits verwendeten wir die Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 (Centralbureau for Schimmelkulturen, Amsterdam). Eine Probe des von Fettsäuren befreiten und neutralisierten, inosithaltigen Lipidhydrolysates wurde zu einer bestimmten Menge Hefesuspension gegeben und nach einiger Zeit die Zunahme des Hefewachstums turbidimetrisch bestimmt. Aus dem Grad der Trübung der Hefelösung kann anhand einer Eichkurve der Gehalt an Inosit ermittelt werden. Den Trübungsgrad der Hefesuspension ermittelten wir im Photometer Eppendorf bei 578 m μ gegen Luft.

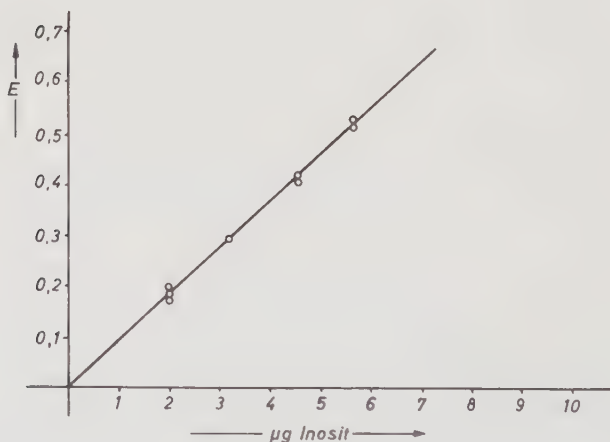


Abb. 43

Mikrobiologische Inositbestimmung
Inosit-Eichkurve

T a b e l l e 64
Quantitative Inositbestimmung

Mykoglyko- lipid	Einwaage mg	Aliquoter Teil d. Hydrolysates von 100 ml/ml	Extinktion	Menge Inosit µg	Inosit %
Candida-	1.09	1.0	0.214	1.90	17.42
	1.09	1.0	0.205	1.80	16.50
	1.09	2.0	0.41	4.1	18.8
Saccharo- myces-	1.36	1.0	0.265	2.48	18.23
	1.36	2.0	0.483	4.94	18.16

Nachweis des Inositmonophosphats:

Candida- und Saccharomycesmykoglykolipide wurden mit 6n wässriger Salzsäure 2 Stunden lang bei 100° hydrolysiert. Die fettsäurefreie, wässrige Lösung engten wir zur Trockene ein und entfernten die letzten Spuren Salzsäure im Exsiccator über feuchtem KOH. Von dem in einer geringen Menge Wasser gelösten Rückstand chromatographierten wir eine kleine Probe aufsteigend auf 2043 b Schl.+Sch.-Papier im Fließmittel Isopropanol-Eisessig-Wasser (3:1:1).

R_f-Wert des Inositmonophosphats: 0.06-0.08

h) Isolierung und Identifizierung der Fettsäuren des Candida- und Saccharomycesmykoglykolipids

Die Mykoglykolipide wurden mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure 8 Stunden lang am Rückfluß gekocht. Aus den abgekühlten Hydrolysaten wurden nach dem im Abschnitt B/III. angegebenen Verfahren die Fettsäuren isoliert und gereinigt. Aus 211.5 mg Candidamykoglykolipid erhielten wir 38.85 mg unveresterte reine Fettsäuren (=18.4% des Mykoglykolipids) und aus 102.35 mg Saccharomycesmykoglykolipid erhielten wir 18.30 mg freie reine Fettsäuren (= 17.85% des Mykoglykolipids). Die Fettsäuren wurden als Fettsäuremethylester gaschromatographiert.

Gaschromatographie:

Das Gemisch der Fettsäuremethylester wurde in einem Apparat der Fa. Barber Colman, Rockford, Illinois mit Hilfe einer pola-

ren Säule aufgetrennt.

Chromatographie der Fettsäuren des Candidamykoglykolipids auf einer DEGS-Säule: Säulenlänge: 0.304 m; Arbeitstemperatur: 176°; Chromatographie der Fettsäuren des Saccharomycesmykoglykolipids auf einer DEGS-Säule: Säulenlänge: 0.304 m; Arbeitstemperatur: 190°.

T a b e l l e 65

Ergebnis der gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren
Die Retentionszeiten der einzelnen Fettsäuren

Fettsäuren	Retentionszeiten/Minuten	
	Candidamykoglyko- lipid	Saccharomycesmykogly- kolipid
Arachinsäure	2.7	5.1
Behensäure	6.9	9.0
Lignocerinsäure	9.8	15.4
Cerotinsäure	14.8	28.7
α -Hydroxybehensäure	17.8	52.65
Cerebronsäure	37.9	107.10
C ₃₀ -Fettsäure (?)	48.9	-
α -Hydroxycerotinsäure	66.2	-

VI. Isolierung und Charakterisierung der Cerebrine der Candidahefe

Die Cerebrine wurden aus einem technischen Candidacerebrin und aus einem Sphingolipidgemisch der Candida utilis-Hefe (Darstellung siehe Seite 151) gewonnen.

a) Cerebrine aus technischem Candidacerebrin

Das technische Candidacerebrin wurde uns von der Fa. Zellstoffabrik Waldhof A.G., Mannheim, zur Verfügung gestellt. Es war ein hellbraunes, leichtes Pulver, das sich in Chloroform, Chloroform-Alkoholgemischen, heißem Methanol oder Äthanol gut löste. In Äther war nur ein Teil des Präparates löslich. In Wasser war die Substanz unlöslich. Chromatographisch war es ein Gemisch aus Sterinen, Cerebrinen und Cerebrosid, in dem der Cerebrinanteil überwog.

Schmp.: 105-108° (nach Kofler, unkorrt.)

Cerebrin I:

8 g technisches Candidacerebrin wurde in 16 ml Chloroform in der Siedehitze gelöst und die Lösung in die 1 1/2-fache Menge heißen Methanols gegossen⁹³⁾. Der in der Kälte ausgefallene Niederschlag wurde 3/4 Stunden lang mit Methanol am Rückfluß gekocht. Den über Nacht ausgefallenen Niederschlag saugten wir ab, wuschen ihn mit Äther und kristallisierten ihn nach Trocknung mehrmals aus Äthanol um.

Ausbeute: 1.35 g

Schmp.: 134-135° (nach Thiele, unkor.)

135-136.5° (nach Kofler, unkor.)

Cerebrin II:

10 g technisches Candidacerebrin wurde im Soxhletapparat erschöpfend mit Diäthyläther extrahiert, das sterinfreie Produkt 1 Stunde lang mit Methanol am Rückfluß gekocht und das über Nacht aus der methanolischen Lösung ausgefallene Cerebrin mehrmals aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4.27 g

Schmp.: 135.4-137.7° (nach Kofler, unkor.)

Cerebrin III:

Die Substanz vom Schmp. 135.4-137.7° (4.27 g) extrahierten wir noch mehrere Tage lang mit Methanol im Soxhletapparat aus der Hülse. Das beim Erkalten aus der methanolischen Lösung ausgefallene Cerebrin kristallisierten wir 2mal aus Methanol um. Nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator erhielten wir eine weiße feinkristalline Substanz.

Ausbeute: 2.37 g

Schmp.: 140-144.5° (nach Kofler, unkor.)

$C_{46}H_{93}O_5N$	(740.2)	ber.	C 74.62%	H 12.67%	N 1.89%
$C_{44}H_{89}O_5N$	(712.2)	ber.	C 74.50%	H 12.50%	N 1.97%
		gef.	C 74.01%	H 12.49%	N 2.03%

Cerebrin IV:

6 g aus Methanol mehrmals umkristallisiertes technisches Candidacerebrin wurde in das Acetylderivat übergeführt²⁵⁾ (5.4 g) und das Acetylprodukt durch Kristallisation aus Petroläther gereinigt (Ausbeute: 3.95 g; Schmp. 67-68°). Aus 1.35 g durch

hydrolytische Spaltung zerlegten Acetylproduktes wurde ein Cerebrin gewonnen, das mit Methanol aus der Hülse extrahiert wurde. Das in der Kälte aus der methanolischen Lösung ausgefallene Cerebrin wurde mit Aceton aus der Hülse extrahiert. Wir erhielten aus der acetonischen Lösung eine weiße kristalline Substanz.

Ausbeute: 0.96 g

Schmp.: 142-143° (nach Thiele, unkor.)

144-145° (nach Kofler, unkor.)

$C_{46}H_{93}O_5N$ (740.2) ber. C 74.62% H 12.67% N 1.89%

$C_{44}H_{89}O_5N$ (712.2) ber. C 74.50% H 12.50% N 1.97%

gef. C 74.12% H 12.14% N 1.99%

b) Cerebrine aus Candida utilis-Sphingolipiden

89.45 mg Alkoholfraktion aus dem Unverseifbaren von Candidahefe (siehe S. 155) wurden an einer Kieselgelsäule mit Chloroform, dem steigende Mengen Methanol zugesetzt wurden, fraktioniert. Alle Fraktionen, die bei dünnschichtchromatographischer Überprüfung (Kieselgel-G; $CHCl_3$ -MeOH = 9:1) Substanzen mit den R_f -Werten 0.65-0.62; 0.47-0.44; 0.32-0.28; enthielten, wurden vereinigt und daraus 61.7 mg Cerebrine gewonnen. Die Cerebrine wurden 1mal aus Methanol umkristallisiert und ergaben 48.32 mg rein weiße, kristalline, phosphorfreie Substanz (Cerebrin V).

Schmp.: 139-140° (nach Kofler, unkor.)

$C_{46}H_{93}O_5N$ (740.2) ber. C 74.62% H 12.67% N 1.89%

$C_{44}H_{89}O_5N$ (712.2) ber. C 74.50% H 12.50% N 1.97%

gef. C 73.97% H 12.01% N 1.96%

Die Löslichkeitseigenschaften der durch Säulenchromatographie gewonnenen Hefecerebrine unterschieden sich nicht von denen der übrigen Cerebrine. Das Cerebrin ist eine rein weiße, kristalline, alkalistabile Substanz, die sich bei längerer Einwirkung von Mineralsäuren in ihre Einzelkomponenten aufspalten läßt. In kochendem Wasser quillt Cerebrin auf, ohne sich zu lösen. In Äther, Benzol, Essigester, Methanol, Äthanol und Aceton ist das Cerebrin in der Hitze leicht, in der Kälte wenig löslich. Gut löslich ist es dagegen in Chloroform, Pyridin oder Mischungen dieser Lösungsmittel.

c) Chromatographie der Cerebrine

Chromatographie auf aktivierten Kieselgel-G-Schichten in verschiedenen, meist chloroform- und methanolhaltigen Fließmitteln. Anfärbung: mit alkalischer Bromthymolblaulösung und mit Rhodamin-B-Lösung. Keine Reaktion mit dem Reagens nach Liebermann-Burchard oder mit dem Bialschen Reagens. Auf papierchromatographischem Wege konnte eine Auftrennung der Cerebrine nicht erreicht werden. Cerebrin und Anhydrocerebrin wurden dünnenschichtchromatographisch getrennt.

T a b e l l e 66

Chromatographie der Cerebrine auf Kieselgel-G im Fließmittel
CHCl₃-MeOH (9:1)

Cerebrine aus Candidahefe isoliert	R _F -Werte		
	Candidacerebrine I	Candidacerebrine II	Candidacerebrine IV
0.59-0.65	0.65	0.65	0.65
0.44-0.47	0.44	0.44-0.52	0.44-0.52
0.28-0.32	0.28	0.28-0.33	0.28-0.33

d) Isolierung und Reindarstellung des Acetylcerebrins

10 g technisches Candidacerebrin (Schmp.: 105-108°) wurde 2mal aus Methanol umkristallisiert und das Kristallisat nach einer Vorschrift von REINDEL²⁵⁾ mit Essigsäureanhydrid in Pyridin azetyliert und das Acetylprodukt durch Umkristallisieren aus Petroläther gereinigt.

Ausbeute: 3.95 g

Acetylcerebrin bestand aus weißen, feinen Kristallnadeln, die sich bei Raumtemperatur in Petroläther gut lösten. Acetylcerebrin war außerdem in Methanol, Äthanol und Pyridin löslich. Schmp.: 67-68° (nach Kofler, uncorr.)

C ₅₄ H ₁₀₁ NO ₉	(908.4)	C	71.38%	H	11.21%	N	1.54%	ber.
C ₅₂ H ₉₇ NO ₉	(880.3)	C	71.00%	H	11.09%	N	1.59%	ber.
		C	70.98%	H	11.01%	N	1.82%	gef.

Das Acetylcerebrin war phosphorfrei. Die Entacetylierung des Acetylproduktes und die Rückgewinnung des Cerebrins erfolgte nach einer Vorschrift von LUBER¹³¹⁾. Das erhaltene Präparat bildete nach Extrahieren und Umkristallisieren mit Methanol und Aceton das Cerebrin IV.

e) Isolierung und Reindarstellung von Anhydrocerebrin aus reinem Cerebrin

Anhydrocerebrin wurde nach den Angaben von TURULLA¹¹⁶⁾ aus reinem Candidacerebrin hergestellt.

1 Teil (=5 g) Candidacerebrin wurde mit 100 Teilen einer 0.3%-igen methanolischen Schwefelsäure 20 Stunden lang am Rückfluß gekocht, die ausgeschiedene Substanz aus der heißen Lösung abfiltriert und die Mutterlauge zur Abscheidung zusätzlichen Anhydrocerebrins weitergekocht.

Gesamtausbeute: 4.08 g (= 81.9% der Ausgangssubstanz)

Zur Reinigung wurde das Anhydrocerebrin mehrmals aus Äthanol umkristallisiert.

Schmp.: 120-121° (nach Kofler, unkor.)

$C_{46}H_{91}NO_4$ (722.2) ber. C 76.48% H 12.72% N 1.94%

$C_{44}H_{87}NO_4$ (694.1) ber. C 76.20% H 12.65% N 2.09%

gef. C 75.96% H 12.92% N 2.12%

Anhydrocerebrin war phosphorfrei. Anhydrocerebrin war eine weiße kristalline Substanz. Sie war in $CHCl_3$ gut löslich. Sie war schwer löslich in siedendem Methanol. Anhydrocerebrin war in Äther und Petroläther unlöslich. Anhydrocerebrin war sehr stabil gegenüber Mineralsäuren. Längeres Kochen der Substanz mit 10%iger methanolischer Schwefelsäure führte zu einer teilweisen Hydrolyse. Eine vollständige Hydrolyse war erst durch Kochen mit 10%iger propylalkoholischer Schwefelsäure erreicht worden.

VII. Nachweis und Isolierung eines Cerebrosids aus *Candida utilis*

1. Chromatographischer Nachweis des Cerebrosids

Mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden konnten wir in den Sphingolipidfraktionen der *Candida utilis*-Hefe ein Cerebrosid oder eine cerebrosidähnliche Substanz nachweisen. Die Anwesenheit eines Cerebrosids in der *Saccharomyces cerevisiae*-Hefe ließ sich nicht eindeutig feststellen.

T a b e l l e 67

Chromatographie cerebrosidhaltiger *Candida*sphingolipidfraktionen auf Kieselgel-G im Fließmittel CHCl_3 -MeOH (9:1)

R _F -Werte	
Unverseifbares der <i>Candida utilis</i> -Hefe (ätherextrahiert)	Alkoholextrakt des Unverseifbaren der <i>Candida utilis</i> -Hefe
0.72	0.77
0.62	0.64
0.52	0.54
0.42	0.45
0.29	0.30
0.14 (Cerebrosid)	0.15 (Cerebrosid)

Der R_F-Wert des *Candida*cerebrosids (0.14-0.15) stimmte mit dem eines der unveresterten Cerebroside aus Rinderhirn überein (Abb. 31, S.81). Die Cerebrosidschwefelsäureester sind durch ihre R_F-Werte deutlich von den unveresterten Cerebrosiden unterschieden.

2. Isolierung des *Candida*cerebrosids

1.462 g des Alkoholextraktes des Unverseifbaren der *Candida utilis*-Hefe (siehe Seite 155) fraktionierten wir an einer Kieselgelsäule mit Chloroform-Methanol. Aus dem durch Fraktionieren mit Chloroform-Methanol (20-25%) gewonnenen Eluat erhielten wir 0.0639 g eines Cerebrosids (= 4.38% der Alkoholfraktion)

Das *Candida*cerebrosid ist leicht löslich in Pyridin, besonders unter Erwärmen. Bei Zimmertemperatur fällt es aus

dieser Lösung nicht aus. Das Cerebrosid ist gut löslich in Chloroform. Bei Zimmertemperatur löst es sich in einer Mischung aus Methanol-Chloroform, bei gelindem Erwärmen in Eisessig-Pyridin. In der Hitze ist das Cerebrosid auch in Äthanol und Methanol und außerdem in Benzol und Eisessig löslich. Aus den alkoholischen Lösungen fällt es beim Abkühlen wieder aus. Candidacerebrosid ist schwerlöslich in Essigester und Aceton und unlöslich in Wasser, Diäthyläther und Petroläther.

Schmelzpunkt: flüssig-kristalliner Zustand: 150-160° (nach Kofler, unkorrt.); Klärungspunkt: 213-214° (nach Kofler, unkorrt.)

Trocknung der Substanz i.H.V. bei 90°.

$C_{42}H_{83}NO_9$	(746.1)	ber. C	67.60%	H 11.21%	N 1.88%
$C_{40}H_{79}NO_9$	(718.0)	ber. C	66.90%	H 11.10%	N 1.95%
		gef. C	67,72%	H 10.70%	N 1.96%

VIII. Charakterisierung und Strukturaufklärung des Candidacerebrosids

Das Candidacerebrosid ist eine weiße kristalline, fettartig sich anfühlende Substanz, die sich an der Luft und am Licht nicht verändert, relativ alkalistabil ist und durch längeres Einwirken mäßig konzentrierter Mineralsäure in seine Einzelbestandteile aufgespalten wird.

1. Chromatographisches Verhalten: Chromatographie auf Kieselgel-G im Fließmittel $CHCl_3$ -MeOH (9:1) (Abb.31, S. 81).

T a b e l l e 68

Dünnschichtchromatographie des Hefecerebrosids

R_f -Wert

Candidacerebrosid	Rinderhirncerebroside	Sterolglykosid
0.15	0.13 0.19-0.23	0.26

Das Candidacerebroside ließ sich mit Rhodamin-B-Lösung, mit Nilblaulösung und mit dem Bialschen Reagens auf Glykolipide in typischer Weise anfärben. Mit Liebermann-Burchard-Reagens gab es keine charakteristische Färbung. Eine Verwechslung mit Sterolglykosiden konnte deshalb mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

2. IR-Spektrum des Candidacerebroside: Typische Banden: 3200-3500 cm^{-1} , 2820-2890 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1000-1100 cm^{-1} , 960 cm^{-1} und 720 cm^{-1} .
3. Nachweis und quantitative Bestimmung des Monosaccharids: 1.20 mg Candidacerebroside wurden mit 0.15 ml 0.5n wässriger Schwefelsäure 12 Stunden lang bei 100° hydrolysiert. Das vom wasserunlöslichen Anteil befreite, mit Dowex-2 (HCO_3^- -Form) entionisierte und konzentrierte Hydrolysat verwendeten wir zur Papierchromatographie. Chromatogrammpapier Schl.+Sch. 2040 bgl; absteigende Chromatographie im Fließmittel n-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3). Anfärbereagens: ammoniakalische Silbernitratlösung und butanolisches Anilinphthalatreagens.

T a b e l l e 69

Chromatographie der Candidacerebrosidezucker

RM-Werte der gefundenen Zucker	RM-Werte der Testsubstanzen (Bezugssubstanz: Mannose = 1.0)
0.85	1.0 Mannose
	0.94 Glukose
	0.83 Galaktose

Die quantitative Bestimmung der Galaktose nahmen wir nach einer Methode von MALLOV⁷⁷⁾ vor.

T a b e l l e 70
Quantitative Bestimmung der Galaktose

Einwaage mg	Hydrolysat ml	Aliquoter Teil ml	Extinktion	Menge Zucker µg	Zucker %
2.25	10.0	1.0	0.281	655	29.1
2.25	10.0	1.0	0.279	650	28.75

4. Isolierung und Identifizierung der Fettsäuren des Candida-cerebrosids

Die aus den salz- oder schwefelsauren Hydrolysaten des Candida-cerebrosids mit Petroläther ausgeschüttelten Fettsäuremethylester wurden mit 1/2n äthanolischer Kalilauge verseift, aus den angesäuerten alkalischen Hydrolysaten durch Extrahieren mit Diäthyläther die freien Fettsäuren isoliert und diese zur gas-chromatographischen Identifizierung mit einer ätherischen Diazomethanolösung verestert.

Die gas chromatographische Analyse der Fettsäuren des Candidacerebrosids wurde unter Verwendung ihrer Methylester im Gasofract Modell 300/B der Fa. Dr.Virus, Bonn, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säulenfüllung: Chromosorb W 60/80 mesh, 10%ig mit Apiezon L imprägniert

Säulendimensionen: 120 mm x 4 mm

Arbeitstemperatur: 225°

Gasdruck: 0.75 kg/cm²; Strömungsgeschwindigkeit des Gases: 180 ml H₂/min.

<u>Gefundene Fettsäure</u>	<u>Retentionszeit</u> Min./Sek.	<u>Testsubstanz</u>	<u>Retentionszeit</u> Min./Sek.
α-Hydroxystearin-säure	10'48''	α-Hydroxystearinsäure	10'48''

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) I.W.L.THUDICHUM, Die Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere, Fr.Pietzcker, Tübingen (1901)
- 2) P.A.LEVENE u. C.J.WEST, J.biol.Chemistry 16, 549 (1913);
ibid. 18, 481 (1914)
- 3) A.LAPWORTH, J.chem.Soc. (London), 103, 1029 (1913)
- 4) E.KLENK, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 185, 169 (1929)
- 5) P.V.SEYDEL, Dissertation Zürich (1941)
- 6) H.E.CARTER, F.J.GLICK, W.P.NORRIS u. G.E.PHILLIPS, J.biol. Chemistry 142, 449 (1942)
- 7) H.E.CARTER, F.J.GLICK, W.P.NORRIS u. G.E.PHILLIPS, J.biol. Chemistry 170, 285 (1947)
- 8) J.KISS, G.FODOR u. D.BANFI, Research 2, 536 (1952)
- 9) H.E.CARTER u. C.G.HUMISTON, J.biol.Chemistry 191, 727 (1951)
- 10) J.KISS, G.FODOR u. D.BANFI, Helv.chim.Acta 37, 1471 (1954)
- 11) K.ONO, J.Japan Biochem.Soc. 19, 133 (1947)
- 12) K.MISLOW, J.Amer.chem.Soc. 74, 5155 (1952)
- 13) G.MARINETTI u. E.STOTZ, J.Amer.chem.Soc. 76, 1347 (1954)
- 14) H.E.CARTER u. Y.FUJINO, J.biol.Chemistry 221, 879 (1956)
- 15) A.LESUK u. R.J.ANDERSON, J.biol.Chemistry 139, 457 (1941)
- 16) H.E.CARTER u. W.P.NORRIS, J.biol.Chemistry 145, 709 (1942)
- 17) H.E.CARTER, W.P.NORRIS, F.J.GLICK, G.E.PHILLIPS u. R.HARRIS, J.biol.Chemistry 170, 269 (1947)
- 18) K.A.KARLSSON, Acta Chem.Scand. 18, 2395 (1964)
- 19) M.PROSTENIK u. B.MAJHOFFER-ORESCANIN, Naturwissenschaften 47, 399 (1960)
- 20) B.MAJHOFFER-ORESCANIN u. M.PROSTENIK, Tetrahedron 12, 56 (1961)
- 21) K.SAMBASIVARAO u. R.E.McCLUER, J.Lipid Research 5, 103 (1964)
- 22) K.A.KARLSSON, Acta chem.Scand. 18, 2397 (1964)
- 23) K.A.KARLSSON, Acta chem.Scand. 18, 565 (1964)
- 24) H.E.CARTER, R.A.HENDRY, S.NOJIMA u. N.Z.STANACEV, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 45, 402 (1960)
- 25) F.REINDEL, Liebigs Ann.Achem. 486, 76 (1930)
- 26) N.BOHOLOS u. W.P.PETERSON, J.biol.Chemistry 149, 295 (1943)
- 27) E.RUPPOL, Bull.Soc.Chim.biol. 19, 1165 (1937)
- 28) E.RUPPOL, Bull.Soc.Chim.biol. 25, 57 (1943)
- 29) E.RUPPOL, J.Pharmac.Belgique (N.S.) 4, 55, 59 (1949)
- 30) T.ODA, J.pharmac.Soc.Japan (Yakugakuzasshi) 72, 136, 139, 142 (1952)
- 31) H.E.CARTER, W.D.CELMER, W.E.M.LANDS, K.L.MUELLER u. H.H. TOMIZAWA, J.biol.Chemistry 206, 613 (1954)
- 32) M.PROSTENIK u. N.Z.STANACEV, Chem.Ber. 21, 961 (1958)
- 33) P.W.O'CONNELL u. S.H.TSIEN, Arch.Biochem.Biophysics 80, 289 (1959)
- 34) M.PROSTENIK u. B.MAJHOFFER-ORESCANIN, Croat.Chem.Acta 32, 11 (1960)
- 35) H.E.CARTER u. H.S.HENDRICKSON, Biochemistry 2, 389 (1963)
- 36) K.L.MUELLER, Thesis, University of Illinois (1953)
- 37) M.PROSTENIK u. B.MAJHOFFER-ORESCANIN, Naturwissenschaften 48, 500 (1961)
- 38) H.E.CARTER, D.S.GALANOS, H.S.HENDRICKSON, B.JANN, T.NAKAYAMA, Y.NAKAZAWA u. B.NICHOLS, J.Amer.Oil Chemists' Soc. 39, 107 (1962)

- 39) J.M.McKIBBIN u. W.E.TAYLOR, J.biol.Chemistry 178, 29 (1949)
- 40) C.C.SWEELEY u. E.A.MOSCATELLI, J.Lipid Research 1, 40 (1959)
- 41) R.KUHN, H.EGGE, R.BROSSMER, A.GAUHE, P.KLESSE, W.LOCHINGER, E.RÖHM, H.TRISCHMANN u. D.TSCHAMPEL, Angew.Chem. 72, 805 (1960)
- 42) J.B.WITTENBERG, J.biol.Chemistry 216, 379 (1955)
- 43) F.H.STODOLA, L.J.WICKERHAM, C.R.SCHOLFIELD u. H.J.DUTTON, Arch.Biochem.Biophysics 98, 176 (1962)
- 44) F.H.STODOLA, u. L.J.WICKERHAM, J.biol.Chemistry 235, 2584 (1960)
- 45) A.ROSENBERG u. E.CHARGAFF, J.biol.Chemistry 232, 1031 (1958)
- 46) K.A.KARLSSON, Nature (London) 188, 312 (1960)
- 47) H.KALLER, Biochem.Z. 334, 451 (1961)
- 48) E.HECHT u. CHR.MINK, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 8, 64 (1952)
- 49) R.O.BRADY u. G.J.KOVAL, J.biol.Chemistry 233, 26 (1958)
- 50) G.J.GREGORY u. T.MALKIN, J.chem.Soc.(London) 2453 (1951)
- 51) B.PALAMETA u. M.PROSTENIK, Croat.Chem.Acta 33, 133 (1961)
- 52) Y.FUJINO u. J.ZABIN, J.biol.Chemistry 237, 2069 (1962)
- 53) N.K.KOCHETKOV, I.G.ZHUKOVA u. I.S.GULKHODED, Dokl.Akad.Nauk (SSSR) 147, 3769 (1962)
- 54) K.SAMBASIVARAO u. R.H.McCLUER, J.Lipid Research 4, 106 (1963)
- 55) B.MAJHOFER-ORESCANIN u. M.PROSTENIK, Croat.Chem.Acta 33, 219 (1961)
- 56) R.O.BRADY u. R.M.BURTON, J.Neurochem. 1, 18 (1956)
- 57) T.SAKAGAMI, J.Biochemistry (Tokyo) 45, 313 (1958)
- 58) K.SAITO, J.Biochemistry (Tokyo) 47, 573 (1960)
- 59) C.J.LAUTER u. E.G.TRAMS, J.Lipid Research 3, 136 (1962)
- 60) E.ROBINS u. O.H.LOWRY, FederationProc. 10, 238 (1951)
- 61) E.ROBINS, O.H.LOWRY, K.N.EYDT u. R.E.McCAMAN, J.biol.Chemistry 229, 661 (1956)
- 62) J.AXELROD, J.REICHENTHAL u. B.B.BRODIE, J.biol.Chemistry 204, 903 (1953)
- 63) E.COCKING u. E.W.JEMM, Biochem.J. 58, XII (1954)
- 64) L.W.WHEELDON u. F.D.COLLINS, Biochem.J. 66, 435 (1957)
- 65) T.MALKIN u. A.G.POOLE, J.chem.Soc.(London) 3470 (1953)
- 66) T.ODA, H.KAMJIA, Chem.Pharmac.Bull.(Tokyo) 6, 682 (1958)
- 67) A.KISIC u.M.PROSTENIK, Croat.Chem.Acta 32, 229 (1960)
- 68) H.E.CARTER, W.D.CELNER, D.S.GALANOS, R.H.GIGG, W.E.LANDS, J.H.LAW, K.L.MUELLER, T.NAKAYAMA, H.H.TOMIZAWA u. E.WEBER, J.Amer.Oil Chemist's Soc. 35, 335 (1958)
- 69) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)
- 70) G.MARINETTI u. E.STOTZ, J.Am.chem.Soc. 77, 6668 (1955)
- 71) M.H.HACK, Biochem.Z. 54, 602 (1953)
- 72) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, Nature (London) 64, 1107 (1949)
- 73) G.SCHMIDT, J.BENOTTI, B.HERSHMAN u. S.J.THANNHAUSER, J.biol.Chemistry 166, 505 (1946)
- 74) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 146, 35 (1942)
- 75) H.WAGNER, J.HÖLZL, Ä.LISSAU u. L.HÖRHAMMER, Biochem.Z. 339, 34 (1963)
- 76) H.WAGNER, Ä.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, J.Lipid Research 3, 177 (1962)
- 77) S.MALLOV, J.M.McKIBBIN u. J.S.ROBB, J.biol.Chemistry 201, 825 (1953)
- 78) P.BÜHM u. G.RICHARZ, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 298, 110 (1954)

- 79) L.A.ELSON u. W.T.J.MORGAN, Biochem.J. 42, 238 (1948)
- 80) G.BLIX, Acta chem.scand. 2, 467 (1948)
- 81) Z.DISCHE, J.biol.Chemistry 171, 725 (1947)
- 82) F.WEYGAND u. H.HOFMANN, Chem.Ber. 83, 405 (1950)
- 83) H.E.CARTER, R.H.GIGG, J.H.LAW, T.NAKAYAMA u. E.WEBER, J.biol. Chemistry 233, 1309 (1958)
- 84) H.WAGNER, Habilitationsschrift München (1960)
- 85) H.E.CARTER, S.BROOKS, R.H.GIGG, D.R.STROBACH u. T.SUAMI, J.biol.Chemistry 239, 743 (1964)
- 86) E.KLENK u. H.LANGERBEINS, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 270, 185 (1941)
- 87) E.VILKAS u. E.LEDERER, Bull.Soc.Chim.biol. 37, 111 (1956)
- 88) E.VILKAS, C.R.hebd.Seances Acad.Sci. 245, 588 (1957)
- 89) E.LEDERER, Angew.Chem. 72, 372 (1960)
- 90) S.NOJIMA, J.Biochemistry (Tokyo) 46, 499, 607 (1959)
- 91) M.C.PANGBORN, Federation Proc. 17, 287 (1958)
- 92) E.KLENK u. N.W.HENDRICKS, Biochim.biophysica Acta 50, 602 (1961) (Amsterdam)
- 93) S.PICARD, Dissertation München (1932)
- 94) F.REINDEL, A.WEICKMANN, S.PICARD, K.LUBER u. P.TURULLA, Liebigs Ann.Chem. 544, 116 (1940)
- 95) A.C.CHIBNALL, H.S.PIPER u. E.F.WILLIAMS, Biochem.J. 55, 711 (1953)
- 96) A.BAMBERGER u. A.LANDSIEDEL, Mh.Chem. 26, 1109 (1905)
- 97) J.ZELLNER, Mh.Chem. 32, 133 (1911)
- 98) J.ZELLNER, Mh.Chem. 32, 1057 (1911)
- 99) L.BARD u. J.ZELLNER, Mh.Chem. 44, 9 (1923)
- 100) N.FRÖSCHL u. J.ZELLNER, Mh.Chem. 50, 201 (1928)
- 101) E.HARTMANN u. J.ZELLNER, Mh.Chem. 50, 193 (1928)
- 102) R.ROSENTHAL, Mh. 43, 244 (1922)
- 103) H.WIELAND, Liebigs Ann.Chem. 548, 270 (1941)
- 104) E.COUTELLE, Dissertation München (1941)
- 105) H.E.CARTER, K.OHNO, S.NOJIMA, C.L.TIPTON u. N.Z.STANACEV, J.Lipid Research 2, 215 (1961)
- 106) H.E.CARTER, R.A.HENDRY, S.NOJIMA, N.Z.STANACEV u. K.OHNO, J.biol.Chemistry 236, 1912 (1961)
- 107) O.ARMBRUSTER u. H.BEISS, Z.Naturforschg. 13b, 75 (1958)
- 108) H.WAGNER, L.HÖRHAMMER u. P.WOLFF, Biochem.Z. 334, 175 (1961)
- 109) H.JATZKEWITZ u. E.MEHL, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 320, 251 (1960)
- 110) H.P.KAUFMANN u. Z.MAKUS, Fette Seifen Anstrichmittel 62, 1014 (1960)
- 111) H.K.MANGOLD, B.G.LANG u. H.SCHLENK, J.Amchem.Soc. 77, 6070 (1955)
- 112) H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 327, 65 (1962)
- 113) S.BOGOCH, Biochem.J. 68, 319 (1958)
- 114) E.KLENK u. G.PADBERG, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 327, 249 (1962)
- 115) H.E.CARTER, O.NALBANDOV u. P.A.TAVORMINA, J.biol.Chemistry 192, 197 (1951)
- 116) P.TURULLA, Dissertation München (1939)
- 117) F.CRÄMER, Papierchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1954), S. 93
- 118) H.JATZKEWITZ u. E.MEHL, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 320, 251 (1960)

- 119) J.SCHERER, Liebigs Ann.Chem. 81, 375 (1855)
- 120) F.FISCHER u. F.H.KURTEN, Biochem.Z. 254, 138 (1932)
- 121) Z.DISCHE, J.biol.Chemistry 167, 189 (1947)
- 122) J.M.HAIS u. K.MACEK, Handbuch d.Papierchromatographie I, VEB G.Fischer-Verlag Jena (1958), S. 735
- 123) S.M.PARTRIDGE, Nature (London) 164, 443 (1949)
- 124) E.CHARGAFF, C.LEVINE u. CH.GREEN, J.biol.Chemistry 175, 67 (1948)
- 125) F.CHAMER, Papierchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1954), S.132
- 126) D.AMINOFF u. W.T.J.MORGAN, Nature (London) 162, 579 (1948)
- 127) G.HÜBSCHER u. J.E.HAWTHORNE, Biochem.J. 67, 523 (1957)
- 128) H.P.KAUFMANN u. Z.MAKUS, Fette Seifen Anstrichmittel 62, 153 (1960)
- 129) H.P.KAUFMANN u. J.SUKO, Fette Seifen Anstrichmittel 64, 434 (1962)
- 130) J.M.McKIBBIN in D.GLICK (Editor) Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publishers, Inc., New York, Vol.VII, (1959), S. 111
- 131) K.LUBER, Dissertation München (1937)

L E B E N S L A U F

Am 26. Oktober 1934 wurde ich, Walter Josef Zofcsik als Sohn des Konstrukteurs Otto Zofcsik und seiner Ehefrau Hermine, geb. Weinzierl, in München geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in München trat ich im Oktober 1945 in das Progymnasium des Klosters Schäftlarn/Ebenhausen ein und wechselte im September 1952 an das Humanistische Gymnasium des Klosters Scheyern/Pfaffenhofen über. Dort legte ich im Juni 1954 die Reifeprüfung ab.

Im Oktober 1954 begann ich meine Berufsausbildung mit einer zweijährigen Tätigkeit als Apothekerpraktikant in der Stadt-Apotheke in Zwiesel/Niederbayern und der St.Ulrichs-Apotheke in München.

Nach der im September 1956 bestandenen pharmazeutischen Vorprüfung nahm ich im Winter-Semester 1956 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Pharmaziestudium auf, das ich im September 1959 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen beendete.

Mein Kandidatenjahr leistete ich 1960 in der Hochvogel-Apotheke in München ab. Am 3. Februar 1961 erhielt ich die Bestallung als Apotheker. Im Januar 1961 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner vorliegende Arbeit. Sie wurde im Frühjahr 1965 abgeschlossen.

